Année scolaire
1973-1974
N° d'ordre : 4

THESES

présentées

A L'UNIVERSITE DE BORDEAUX II
Unité d'Enseignement et de Recherches des Sciences pharmaceutiques

pour

LE DOCTORAT D'ETAT EN PHARMACIE

par

Bernard LE MOIGNE
Pharmacien
Ancien Interne – Médaille d'Or des Hôpitaux de Bordeaux
Ancien Attaché – Assistant de Sciences fondamentales
C.E.S. National de Bactériologie
C.E.S. de Bactériologie et Virologie systématiques (Biologie humaine)
C.E.S. de Microbiologie générale (Maîtrise ès Sciences)
né le 25 octobre 1947 à Bordeaux (Gironde)

1ere Thèse : La réaction de formation des hydroxamates ferriques

Adaptation autoanalytique appliquée à l'étude des Bêta Lactamines et Bêta Lactamases

2e Thèse : La détermination du rapport Lécithine/Sphingomyéline du liquide amniotique. Son intérêt en médecine périnatale.

Présentées et Soutenues publiquement le 19 juillet 1974
devant la Commission d'Examen

MM.	P. MESNARD, Professeur	Président
	J. MASQUELIER, Professeur	Juges
	Ch. DULONG de ROSNAY, Professeur	
	R. CROCKETT, Professeur	

Editions Bergeret, 71-73, rue Leyteire – BORDEAUX – Tél. (56) 91.12.59

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547319_0001

Année scolaire
1973-1974
N° d'ordre : 4

THESES

présentées

A L'UNIVERSITE DE BORDEAUX II
Unité d'Enseignement et de Recherches des Sciences pharmaceutiques

pour

LE DOCTORAT D'ETAT EN PHARMACIE

par

Bernard LE MOIGNE
Pharmacien
Ancien Interne – Médaille d'Or des Hôpitaux de Bordeaux
Ancien Attaché – Assistant de Sciences fondamentales
C.E.S. National de Bactériologie
C.E.S. de Bactériologie et Virologie systématiques (Biologie humaine)
C.E.S. de Microbiologie générale (Maitrise ès Sciences)
né le 25 octobre 1947 à Bordeaux (Gironde)

1ere Thèse : La réaction de formation des hydroxamates ferriques

Adaptation autoanalytique appliquée à l'étude des Bêta Lactamines et Bêta Lactamases

2e Thèse : La détermination du rapport Lécithine/Sphingomyéline du liquide amniotique. Son intérêt en médecine périnatale.

Présentées et Soutenues publiquement le 19 juillet 1974
devant la Commission d'Examen

MM.	P. MESNARD, Professeur	Président
	J. MASQUELIER, Professeur	Juges
	Ch. DULONG de ROSNAY, Professeur	
	R. CROCKETT, Professeur	

Editions Bergeret, 71-73, rue Leyteire – BORDEAUX – Tél. (56) 91.12.59

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MES PARENTS

Qu'ils trouvent ici le résultat de nombreux sacrifices et le témoignage de notre profond attachement.

A MON FRERE, A MA SOEUR, A MA BELLE-SOEUR

A MA GRAND-MERE et TOUTE MA FAMILLE

Avec toute notre tendresse.

A TOUS MES AMIS

Nos remerciements s'adressent également à :

Messieurs les Professeurs H. LAUBIE et R. GOLSE

Qui ont fort aimablement accepté de constituer le comité de lecture de ce travail.
Qu'ils reçoivent l'assurance de notre respectueux et sincère attachement.

et à tous ceux qui, au cours de ce travail, nous ont apporté une aide efficace :

Monsieur le Professeur J.B. FOURTILLAN

En raison de notre très grande amitié et pour ses nombreux conseils tant chimiques qu'en matière de calcul statistique,

Monsieur le Professeur J. LATRILLE et Madame le Docteur F. BOINEAU

qui, par leurs travaux, nous ont précédé dans l'étude des β lactamines et des β lactamases. Ils nous ont fait profiter de leurs nombreuses connaissances en ce domaine,

Mademoiselle M.T. LESGOUARRES

pour la réalisation des nombreuses préparations bactériologiques,

Madame FARGE

pour la mise en page du texte et

Monsieur BARRERE

pour la réalisation de clichés photographiques,

ainsi que l'ensemble du personnel des laboratoires de Bactériologie de l'Hôpital Pellegrin et de la Faculté de Médecine.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur R. CROCKETT

Professeur titulaire à Titre personnel
de Biochimie pharmaceutique
Licencié ès Sciences
Ancien interne en Pharmacie
des Hôpitaux de Bordeaux
Médaille d'Or de l'internat
Ancien Assistant des Hôpitaux
Chevalier des Palmes académiques

Au cours de nos années d'Internat vous nous avez fait partager votre enthousiasme et vos compétences en matière d'automation et d'enzymologie.

Veuillez trouver dans ce travail l'application de vos principes et l'assurance de notre respectueux et sincère attachement.

Monsieur le Professeur Ch. DULONG de ROSNAY

Professeur de Bactériologie - Virologie
Biologiste des Hôpitaux, Chef de Service
Chevalier des Palmes académiques

C'est en qualité d'Interne en Pharmacie que vous nous avez reçu au laboratoire de bactériologie de l'hôpital Pellegrin.

Dès ces premiers temps, nous avons apprécié vos immenses connaissances en matière de Biologie médicale. Plus tard, vous avez su nous communiquer le goût pour la recherche en nous inspirant ce travail.

Vous nous avez toujours manifesté votre soutien dans nos difficultés d'interne et votre entière confiance pour les délicats travaux effectués dans votre service.

Votre interne, votre assistant, votre élève, ne savent comment vous remercier.

Soyez toujours assuré de notre profonde admiration et de notre plus sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur J. MASQUELIER

Directeur de l'U.E.R. de Sciences pharmaceutiques
Professeur de Matière médicale et microbiologie
Officier des Palmes académiques
Chevalier du Mérite agricole
Docteur ès Sciences

Vous manifestez un immense intérêt pour tout ce qui appartient au domaine de la Microbiologie.

Nous souhaitons que ce travail aille dans le sens de vos recherches et vous remercions de bien vouloir être de nos juges.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur P. MESNARD

Professeur de Chimie organique et Chimie analytique
Membre correspondant de l'Académie de Pharmacie
Docteur ès Sciences physiques
Inspecteur principal des Pharmacies
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Ordre national du Mérite
Officier des Palmes académiques
Officier de la Santé publique
Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine
Membre correspondant de la Réal Académia de Farmacia de Madrid
Membre d'Honneur de la Société de Pharmacie de Bénarès (Inde)

Dès notre entrée à la faculté de Pharmacie, vous nous avez accueilli dans votre laboratoire. Très captivé par votre enseignement et, au contact de vos plus proches collaborateurs nous avons appris la chimie analytique puis la chimie organique.

Devenu pharmacien, le choix d'une orientation biologique nous a permis d'appliquer les nombreuses connaissances chimiques à un domaine tout à fait nouveau pour nous : la bactériologie. Il en est résulté ce travail que vous nous faites l'honneur de juger aujourd'hui.

Nous vous remercions très sincèrement d'avoir bien voulu accepter la présidence de ce jury.

Vous nous avez toujours manifesté une grande sympathie.

A notre tour qu'il nous soit permis de vous témoigner, notre grande admiration et de vous exprimer notre profond attachement.

LA REACTION DE FORMATION DES HYDROXAMATES FERRIQUES

Adaptation autoanalytique appliquée
à l'étude des bêta lactamines
et bêta lactamases

I N T R O D U C T I O N

Le dosage des β lactamines peut être réalisé par différentes techniques microbiologiques et chimiques, mais il semble nécessaire de définir ce groupe d'antibiotiques qui a retenu notre attention tout au long de ce travail.

Les β lactamines sont caractérisées par :

- la présence d'un cycle β lactame dans la structure chimique de ces molécules,
- le même mode d'action antibiotique : elles empêchent, dans la synthèse du mucocomplexe de Park, la mise en place du pont pentaglycine. Elles provoquent ainsi la production de bactéries dépourvues de paroi protectrice : *les sphéroplastes* extrêmement fragiles, sensibles aux variations de pression osmotique.

La fonction antibiotique de ces molécules est liée à la présence du *cycle β lactame* ou *cycle azétidine*.

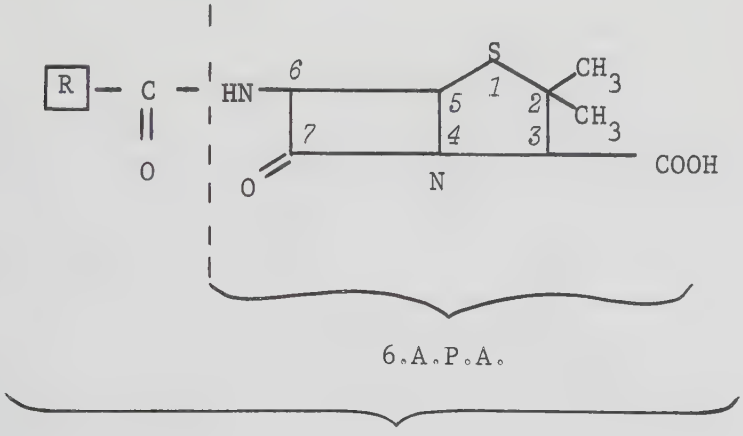
Les β lactamines se subdivisent en deux groupes :

- *Les Pénicillines* dérivées de l'acide 6 amino pénicillanique (6.A.P.A.)
- *Les Céphalosporines* dérivées de l'acide 7 amino céphalosporanique (7.A.C.S.).

Au sein de chaque famille les différentes molécules diffèrent par la nature de leurs chaînes latérales en position 6 pour les pénicillines et en position 3 et 7 pour les céphalosporines.

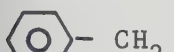
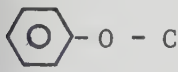
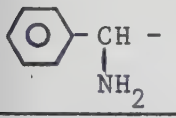
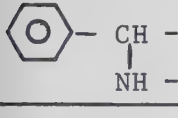
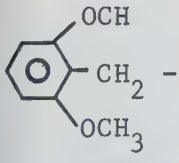
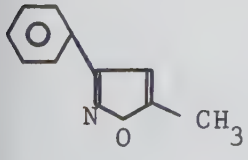
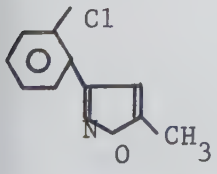
Les différentes molécules étudiées au cours de nos travaux présentent les structures suivantes :

A. LES PENICILLINES.



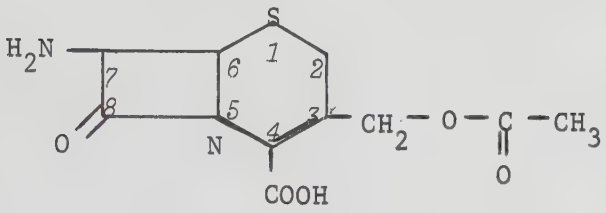
Structure générale des pénicillines

Selon la nature du radical R de la chaîne latérale en position 6 on distingue :

R	*Dénomination*		*Poids moléculaire*
	chimique	*commerciale*	
	Benzylpénicilline	Spécilline	356
	Pénicilline V	Oracilline	389
	Ampicilline	Totapen	350
	Métampicilline	Suvipen	364
	Carbénicilline	Pyopen	422
	Méthicilline	Flabelline	434
	Oxacilline	Bristopen	442
	Clocacilline	Staphybiotic	476

B. LES CEPHALOSPORINES.

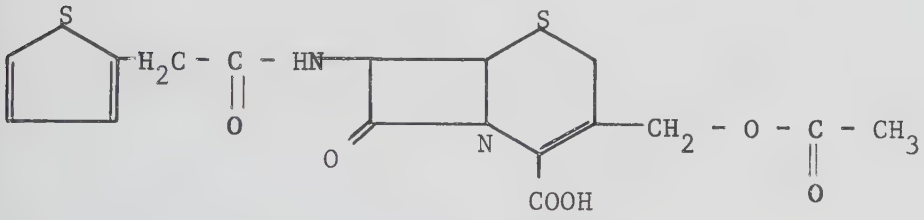
Dérivées de l'acide 7 amino céphalosporanique de structure suivante :



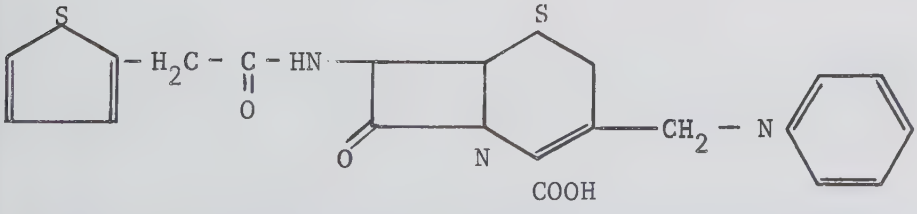
PM = 272

Les principales céphalosporines sont :

- *La céphalotine*, commercialisée sous le nom de Kéflin, présente un poids moléculaire de 418.



- *La céphaloridine*, commercialisée sous le nom de Céporine ou Kéflodin, présente un poids moléculaire de 415.



Le dosage de ces antibiotiques peut être réalisée par différents protocoles expérimentaux, fondés sur des principes analytiques variés, adaptés à des besoins particuliers.

En effet, les antibiotiques du groupe des β lactamines intéressent pour des raisons différentes, *l'industrie pharmaceutique* qui les prépare, les *microbiologistes* qui étudient leurs rapports de sensibilité ou de résistance avec les bactéries. Dans ce dernier domaine, l'intérêt sera d'ordre purement médical ou au contraire d'ordre fondamental, notamment en ce qui concerne les phénomènes de résistance.

Ces processus de résistance bactérienne font intervenir différents mécanismes :

- *enzymatiques :* présence de β lactamases constitutives ou transférables, qui possèdent la propriété de catalyser l'hydrolyse du cycle azétidine. Cette hydrolyse entraîne la perte de l'activité antibiotique de la molécule à fonction β lactame.

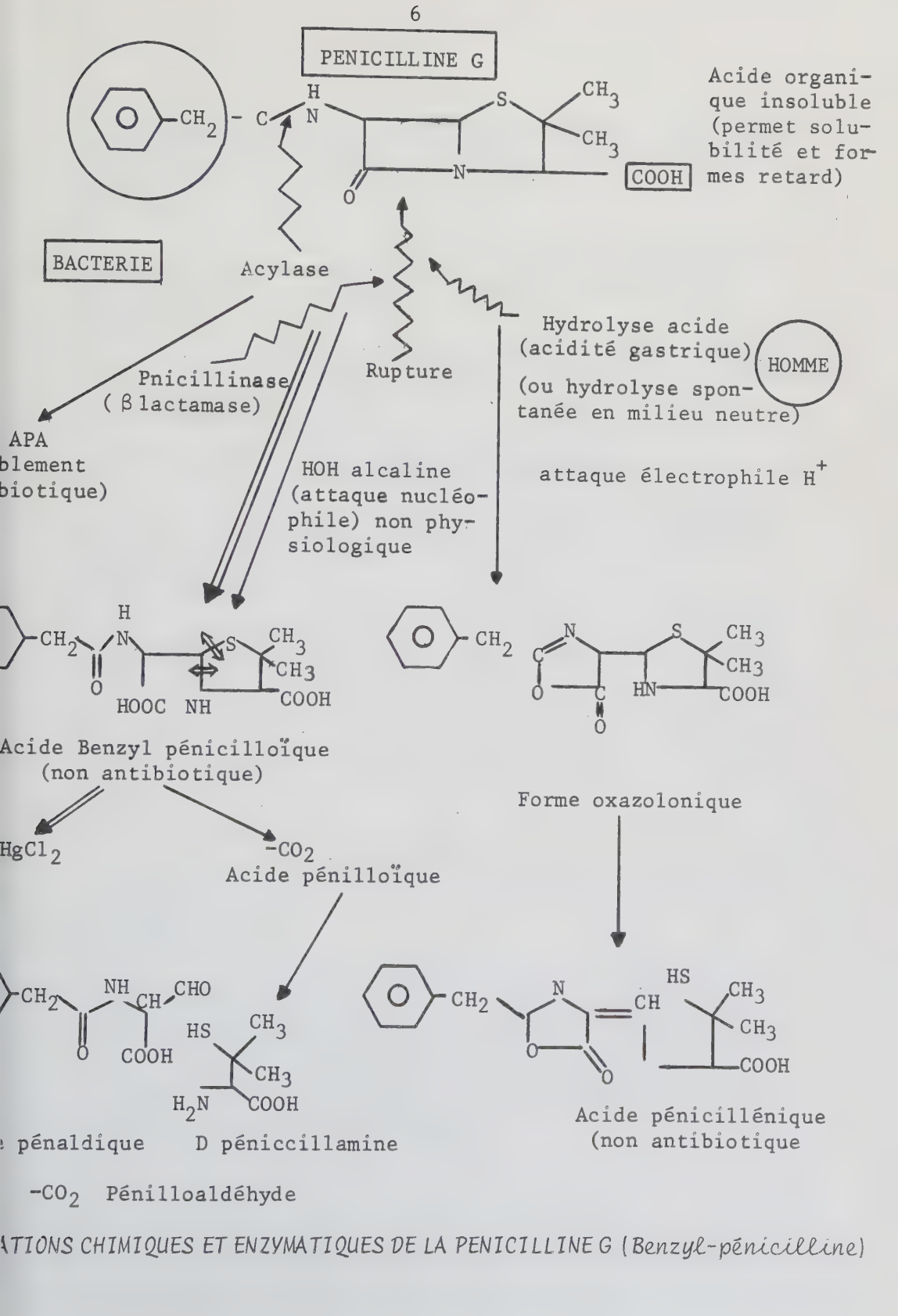
  La figure n° 1 représente le mécanisme d'hydrolyse β lactamasique de la benzylpénicilline comparé aux hydrolyses chimiques acide ou alcaline.

- *de perméabilité cellulaire,* encore mal connus, indépendants des β lactamases.

Au niveau de la production comme au niveau de l'utilisation (examens médicaux, études biochimiques fondamentales) l'analyste est conduit à doser "l'antibiotique" dans certains cas, le "substrat enzymatique" dans d'autres.

Nécessairement, les protocoles expérimentaux sont fonction des besoins. La sensibilité des techniques est guidée par l'étendue du domaine de concentrations recherchées.

Le dosage industriel des antibiotiques dans les jus de fermentation lors de leur production nécessite des techniques assez peu sensibles. Par contre, le dosage



ATIONS CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES DE LA PENICILLINE G (Benzyl-pénicilline)

d'antibiotique circulant chez un sujet soumis à un traitement par une β lactamine nécessite des méthodes extrêmement sensibles en raison des faibles concentrations impliquées.

Ainsi, comme nous le verrons ultérieurement, l'industrie utilise des méthodes chimiques relativement peu sensibles, de l'ordre de 100 µg/ml (Méthodes de PERRET (24), de FORD (9)).

Le bactériologiste par contre, utilise des méthodes microbiologiques liées à la sensibilité de souches bactériennes de référence.

Mais un troisième domaine s'est développé en vue de l'étude de l'activité β lactamasique.

Les méthodes précédemment citées ont été appliquées à ces études. De ce fait, certains auteurs ont utilisé des méthodes très sensibles, d'autres beaucoup moins sensibles.

De tous les travaux effectués dans ce domaine, il apparaît nécessaire de mettre en oeuvre des méthodes d'investigation extrêmement sensibles. D'où la nécessité de perfectionner les techniques de base afin de les adapter aux besoins, pour obtenir des méthodes extrêmement sensibles. Dans ce sens, NOVICK (22) utilise une méthode microiodométrique qui a supplanté la méthode de PERRET (24).

Par contre, la méthode de FORD (9), fondée sur la formation d'hydroxamates ferriques n'a pas connu une évolution comparable d'où son discrédit auprès des chercheurs fortement attirés par les techniques microiodométriques.

Les études entreprises dans le laboratoire de bactériologie de l'Hôpital Pellegrin, relatives à la dégradation enzymatique des β lactamines, nous ont conduit à rechercher une méthode applicable au travail en série, permettant d'évaluer l'activité enzymatique β lactamasique d'un très grand nombre de germes vis-à-vis de la plupart des β lactamines.

Cette technique devait être :

- suffisamment sensible pour apprécier des concentrations inférieures à 10 µg/ml de β lactamines
- reproductible et assez souple :
  - . pour être adaptée aux divers types de β lactamines,
  - . utilisable sur une large échelle de concentrations,
  - . adaptable à l'enregistrement continu de cinétiques de dégradations des substrats par les enzymes afin de déterminer leurs constantes biochimiques.

Pour différentes raisons, notre choix s'est porté sur la réaction de FORD ou plus exactement sur la réaction de formation d'hydroxamates ferriques.

Avant d'entreprendre l'étude du protocole expérimental il est nécessaire de replacer ce principe réactionnel au sein des différentes méthodes dont nous venons de donner un bref aperçu afin de motiver notre choix. Puis, nous exposerons quelques applications de cette technique en vue de son exploitation.

P R E M I E R E P A R T I E

DOSAGE DES β LACTAMINES - ETUDE ANALYTIQUE

LES METHODES CHIMIQUES DE DOSAGE DES β LACTAMINES

Nous verrons que les méthodes microbiologiques peuvent être considérées comme techniques de référence.

Les méthodes chimiques de dosage des β lactamines retiendront seules notre attention.

Elles se classent en deux groupes :

Les méthodes indirectes qui dosent l'acide pénicilloïque résultant de la dégradation du substrat pénicilline.

Les méthodes directes qui utilisent une réaction analytique du substrat lui-même.

Les méthodes indirectes sont généralement préférées aux méthodes directes en raison de leur grande sensibilité.

METHODES INDIRECTES.

On distingue :

1. Les méthodes iodométriques.

L'hydrolyse enzymatique β lactamasique ou alcaline des β lactamines conduit à la formation d'acides pénicilloïques par ouverture du cycle β lactame. Ces acides pénicilloïques, comme toutes les *thiazolidines N non acylées*, réagissent avec l'iode. La consommation d'iode observée varie selon les auteurs mais on considère généralement qu'une molécule d'acide pénicilloïque consomme 8 à 9 atomes d'iode (ALICINO 1946 (1), TUCKER 1954 (32), PERRET 1954 (24)).

De la même façon, on considère qu'une molécule de céphalosporine hydrolysée consomme 4 atomes d'iode.

La stoechiométrie de la réaction : iode - acide pénicilloïque n'a pas été établie avec précision. Elle est fonction des conditions de température, de pH, de temps.

Récemment, LINDSTROM et NORDSTRUM (18) ont signalé que les hydrolysats de céphaloridine consommaient 3 à 5 fois moins d'iode que les hydrolysats de pénicillines.

Diverses adaptations techniques ont été proposées :

Technique titrimétrique de PERRET (24) :

Elle est considérée comme méthode de référence. Elle réalise le dosage de l'acide benzyl-pénicilloïque en déterminant l'excès d'iode introduit par le thiosulfate.

Méthodes microiodométriques :

Ces techniques sont beaucoup plus sensibles que la méthode de PERRET (24). La plus utilisée est

celle de NOVICK (22). Elle est basée sur la vitesse de décoloration d'un complexe Iode-empois d'amidon par l'acide pénicilloïque. Dans cette technique, particulièrement adaptée au dosage des β lactamines, la réaction d'hydrolyse est faite en présence du complexe. Cette technique est très utilisée pour déterminer l'activité β lactamasique, l'hydrolyse du cycle β lactame étant réalisée par voie enzymatique.

2. *Les méthodes manométriques.*

L'acide pénicilloïque libéré par l'enzyme en présence d'un tampon bicarbonaté provoque le déplacement du CO_2, apprécié manométriquement. Cette méthode a été décrite par HENRY et HOUSEWRIGHT (13). Nous avons réalisé une adaptation de cette méthode, le CO_2 libéré étant apprécié par décoloration d'une solution alcaline de phénolphtaléine. Cette technique, en raison de l'instabilité des réactifs, ne nous a pas paru satisfaisante.

METHODES DIRECTES.

Nous envisagerons essentiellement :

Méthode de SCUDI (29) :

Les pénicillines réagissent avec la N-(1 - naphtyl - 4 azobenzène) - éthylène diamine pour former un chromogène rouge absorbant à 540 nm. Cette méthode permet de doser 1 µg/ml. Bien que très sensible, cette technique est longue et laborieuse.

Méthodes à l'hydroxylamine :

Nous reviendrons en détail sur le principe de cette réaction basée sur la formation d'hydroxamates ferriques.

Cette méthode décrite par STAAB, RAGAN, BINCKLEY (31) en 1946 a été utilisée par FORD (9) en 1947, puis par BOXER et EVERET (3) en 1949, KNOX et SMITH (16) en 1962, SNELL (30) en 1954. De ces adaptations, celle de FORD est la plus connue. Cette technique permet de doser facilement 100 µg/ml de pénicilline. Sa limite extrême de sensibilité, en opérant dans les meilleures conditions, est de 20 µg/ml pour la benzylpénicilline, selon HAMILTON MILLER (12).

Méthode spectrophotométrique (23) :

Par suite de leur structure chimique, les β lactamines en solution dans l'eau, absorbent dans l'U.V. à différentes longueurs d'ondes caractéristiques.

Pour la benzylpénicilline, on note 3 bandes d'absorption à 252 nm, 258 nm, 264 nm, pour les céphalosporines une bande à 260 nm.

La rupture du cycle β lactame provoque un déplacement de la bande d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées.

Selon RICHMOND et SYKES (26), cette méthode se prête aisément à l'autoanalyse. Sa sensibilité est comparable à celle des méthodes microiodométriques. Elle ne s'applique qu'à des solutions pures de β lactamines : les nombreuses interférences d'absorption U.V. la rendent inadaptée à l'étude de l'activité des β lactamases.

Méthodes autoanalytiques :

Certaines de ces méthodes de base ont été adaptées à l'automation par différents auteurs. Nous ne retiendrons que les techniques iodométriques, microiodométriques et à l'hydroxylamine.

Méthodes autoanalytiques iodométriques.

Méthode de FERRARI, RUSSO ALESI et KELLY (8).

Ces auteurs apprécient la décoloration du complexe I_3^- (solution d'iode dans l'iodure de K.) par l'acide pénicilloïque à 420 nm, étant dans l'impossibilité technique de l'apprécier à son maximum d'absorption, soit 360 nm. Cette technique ne permet pas de doser moins de 200 µg/ml de benzyl-pénicilline.

GOODALL et ROSEDA DAVIES (10) dosent les pénicillines après hydrolyse alcaline ou enzymatique. L'acide pénicilloïque est mis en présence d'un excès d'iode qui forme un complexe coloré avec l'empois d'amidon dont le maximum d'absorption est situé à 600 nm, mais qu'ils mesurent à 525 nm.

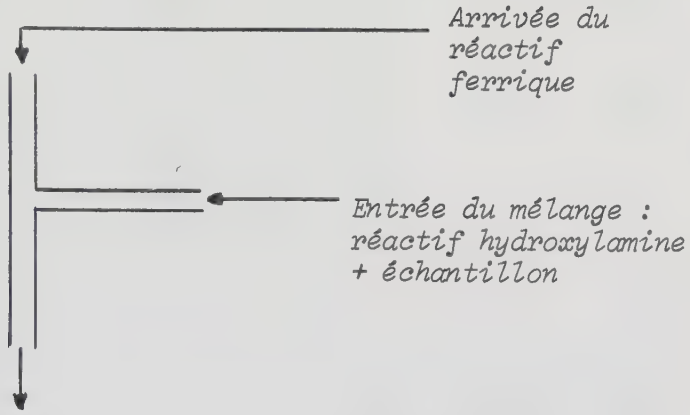
LINDSTROM et NORDSTRUM (18), plus récemment, ont adapté à l'auto-analyse la méthode microiodométrique de NOVICK (22).

Méthodes autoanalytiques à l'hydroxylamine.

Divers auteurs ont adapté la méthode de FORD (9) à l'autoanalyse.

NIEDERMEYER (21) et collaborateurs utilisent 2 moles d'hydroxylamine pour un atome de fer ferrique. Le seuil de sensibilité est de 150 µg/ml. Cette technique a été reprise par AVANZINI et collaborateurs (2) qui utilisent des quantités équimoléculaires d'hydroxylamine et de sel ferrique.

Au cours de la réaction un précipité se forme. Son élimination est réalisée par un artifice technique au moyen d'une connection en T.



Sens de circulation : élimination des précipités en suspension dans le mélange réactionnel.

Il est possible de réaliser une étude comparée de ces différentes techniques du point de vue seuil de sensibilité et échelle de sensibilité.

La valeur d'une technique est d'autant plus grande que sa sensibilité permet, dans les mêmes conditions expérimentales, de déterminer à la fois de faibles concentrations et des concentrations plus élevées.

TABLEAU N° 1

Méthode	*Seuil de sensibilité*	*Echelle des valeurs*
PERRET (24)	100 µg/ml	
NOVICK (22)	1 µg/ml	
SCUDI (29)	1 µg/ml	
FORD (9)	100 µg/ml	
FERRARI (8)	200 µg/ml	de 1000 à 8000 µg/ml
GOODALL (10)		0 à 15 µg/ml
LINDSTROM (18)	1° 1,5 µg/ml 2° 15 µg/ml	1,5 à 6 µg/ml 15 à 75 µg/ml
NIEDERMEYER (21)	150 µg/ml	de 150 à 6000 µg/ml
AVANZINI (2)	150 µg/ml	150 à 6000 µg/ml

Ces différentes méthodes se classent en deux catégories en fonction de leur seuil de sensibilité.

Méthodes sensibles dont le seuil de sensibilité est voisin de 1 µg/ml. Mais ces méthodes présentent une échelle de valeurs relativement limitée (NOVICK (22), GOODALL (10), LINDSTROM (18)).

Méthodes moins sensibles dont le seuil de sensibilité est voisin de 100 µg/ml. Par contre, l'échelle de valeurs est assez étendue (FERRARI (8), NIEDERMEYER (21), AVANZINI (2)).

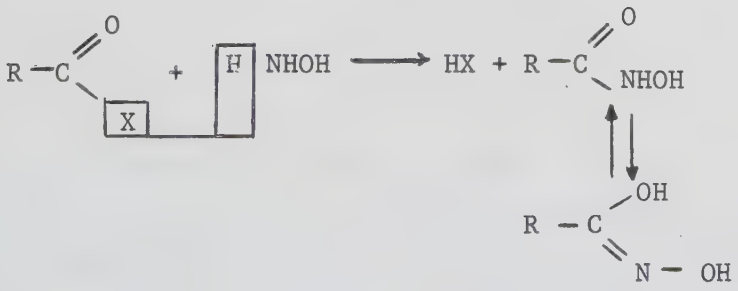
Le but de ce travail était d'obtenir une méthode sensible permettant de déterminer des concentrations dans une échelle de valeurs relativement étendue. C'est ce que nous avons obtenu après automatisation et sensibilisation de la méthode de FORD (9) selon SNELL (30).

-:-

LA REACTION DE FORD - FORMATION D'HYDROXAMATES FERRIQUES

Les dérivés des acides carboxyliques : chlorures, anhydrides, esters et amides, forment avec l'hydroxylamine des *acides hydroxamiques* pouvant exister sous deux formes tautomères *N hydroxy-amides et hydroxy-oximes*.

Réaction de formation :



Les lactones et les lactames se comportent comme les esters. A ce titre, les β *lactamines* réagissent par leur fonction lactame.

A partir de ces dérivés hydroxamiques, il est possible d'obtenir des sels métalliques colorés, soit de cuivre de couleur verte, soit de fer de couleur rouge : *les hydroxamates ferriques*.

Ils sont solubles selon WERNER ou forment des complexes stables en milieu acide ou alcalin, ce qui les distingue des complexes ferriques dérivés des phénols.

La formation de ces sels ferriques a été appliquée aux β lactamines. La réaction se traduit par l'ouverture du cycle β lactame, consécutive à une *attaque nucléophile* par des agents nucléophiles $\boxed{\Theta\ NHOH}$ avides de charges positives.

Cette attaque a lieu avec toutes les β lactamines quelle que soit la nature de la chaîne latérale, contrairement à ce qui se passe pour les *attaques électrophiles*.

Les acides hydroxamiques formés réagissent sur le fer trivalent pour former un complexe hexacoordiné dont l'intensité colorée varie en fonction de la concentration.

Sans préciser le mécanisme, les réactions sont schématisées sur la figure page suivante.

Nous verrons ultérieurement que le complexe ferrique absorbe entre 480 nm et 500 nm et que sa formation, obéissant à la loi de BEER LAMBERT, la réaction qualitative revêt un intérêt quantitatif.

Figure n° 2 : spectre d'absorption.

En fonction de ce que nous venons d'indiquer, nous constatons :

- que la réaction de formation d'hydroxamates ferriques n'est pas spécifique des β lactamines,
- qu'elle implique l'ouverture du cycle β lactame.

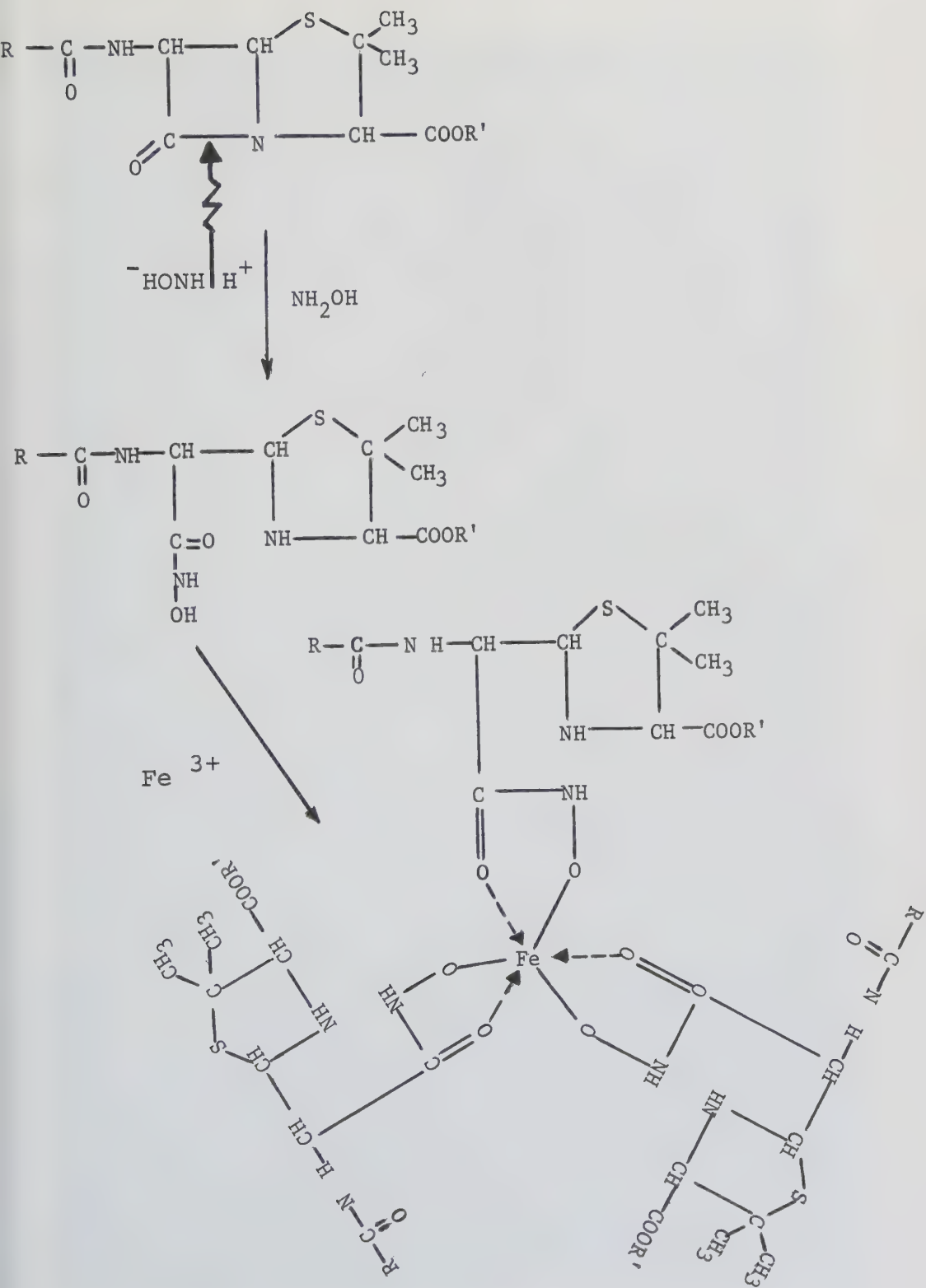

R — C — NH — CH — CH — S — C(CH3)2
O
C — N — CH — COOR'
O
⁻HONH H⁺
NH2OH
NH
OH
Fe 3+
Fe

FIGURE n° 2 - Spectre d'absorption -

Les nombreux composés dérivés des acides carboxyliques (chlorures, esters, amides, lactones) susceptibles de donner lieu à cette réaction, ne réagissent pas tous de la même façon, mais avec une intensité variable.

Les plus sensibles sont les esters qui réagissent comme les anhydrides, les chlorures d'acides et les lactames. Cette réaction connaît une application biochimique pour la détermination des acides gras estérifiés.

Les amides réagissent plus lentement sur l'hydroxylamine. Il est souvent nécessaire d'effectuer la condensation par chauffage dans des solvants à point d'ébullition élevé. Dans les mêmes conditions, les nitrites peuvent réagir pour former des amidoximes dont les sels ferriques sont colorés en rouge.

Des réactions peuvent être observées à partir des urées, guanidines, hydrazides et amidines ainsi qu'avec certains composés polyhalogénés : chloroforme, bromoforme, chloral, acide trichloracétique. L'iodoforme et le tétrachlorure de carbone font exception.

Quelques aldéhydes peuvent également réagir par suite de la formation intermédiaire d'ester par réaction de CANNIZZARO : formaldéhyde, benzaldéhyde, vanillal et anisaldéhyde.

Les dérivés nitrés aliphatiques enfin, peuvent introduire une cause d'erreur lorsqu'ils présentent en α un hydrogène énolisable. Ils conduisent directement à des colorations rouges par action des sels ferriques en milieu alcalin.

Les composés susceptibles de donner cette réaction sont nombreux et variés. De ceci, nous tirons deux constatations :

La technique que nous proposons est applicable à des solutions pures : soit de préparations pharmaceutiques en vue de leur contrôle, soit des solutions pures de β lactamines en vue d'étudier les activités β lactamasiques. Ainsi les nombreuses sources d'interférences sont automatiquement éliminées.

Nous verrons ultérieurement que cette réaction est applicable aux milieux complexes artificiels : bouillons de culture pour bactériologie. Elle n'est pas directement applicable aux milieux biologiques : sérum, urine, en raison d'interférences dues à des chromogènes.

La technique que nous proposons, mise au point avec les β lactamines, peut très bien être adaptée à la détermination d'un composé organique susceptible de donner la même réaction. Nous l'avons pour notre part appliquée à la détermination de *l'acide acétyl salicylique*. La sensibilité est comparable à celle observée pour les β lactamines.

La formation d'acides hydroxamiques implique l'ouverture du cycle β lactame. Cette réaction est donc spécifique du substrat β lactamine et non de ses dérivés même les plus proches, tels les acides pénicilloïques.

La rupture de la liaison β lactame est à rapprocher de la perte du pouvoir antibiotique des β lactamines après hydrolyse alcaline ou β lactamasique, qui réalise l'ouverture du même β lactame. Cette réaction se prête donc tout particulièrement à l'étude des β lactamases par détermination du substrat non dégradé par la pénicilline.

Si la formation d'acides hydroxamiques fait intervenir la liaison β lactame, la chaîne latérale en position 3 de la molécule β lactamine peut, suivant sa structure, intervenir dans la consommation d'hydroxylamine.

C'est ce qui se produit en présence d'une fonction ester (cas du Kéflin) dans la chaîne latérale.

Applications quantitatives de la réaction.

Technique de FORD (9).

En 1947, J. H. FORD propose une amélioration de la technique proposée par STAAB, RAGAN, BINKLEY (28) en vue de l'appliquer essentiellement au dosage des β lactamines dans les milieux de fermentation.

Pour éliminer différentes impuretés susceptibles de donner la même réaction, FORD réalise un "blanc réactif" contenant la même concentration de pénicilline que la solution à doser mais auquel il ajoute de la pénicillinase afin de dégrader la pénicilline. Par différence entre les intensités colorées des deux tubes : blanc et dosage, il en déduit la concentration en pénicilline.

Réactifs.

- Solution de chlorhydrate d'hydroxylamine 4 M, soit 70 g dans 250 ml d'eau distillée.
- Solution de soude 3 M.

Le réactif est obtenu par mélange à volumes égaux des deux solutions. Son pH est de 6,4. Il est stable à température ambiante durant plusieurs semaines, mais ne doit être utilisé que quelques heures après sa préparation.

- Tampon phosphate pH 7 : 2,5 millimolaire
- Solution de pénicillinase à 4000 Unités/ml
- Tampon acétate obtenu par mélange :
  - d'un volume d'une solution 0,1 M d'acide acétique
  - de 4 volumes d'une solution 0,1 M d'acétate de sodium
- Réactif ferrique : chlorure ferrique, 6 H_2O à 10 p. 100 dans une solution 0,1 N d'acide chlorhydrique.

Mode opératoire.

Les solutions de pénicilline sont réalisées en tampon phosphate pH 7. Les jus de fermentation sont clarifiés par filtration sur papier.

5 ml d'échantillon subissent un traitement par une goutte de solution de pénicillinase.

Laisser agir 4 heures à température ambiante ou 1 heure à 38°.

TABLEAU N° 2

	Blanc réactif	*Dosage*
Solution à doser		2 ml
Solution traitée par la pénicillinase	2 ml	
Tampon acétate	2 ml	2 ml
Réactif à l'hydroxylamine	2 ml	2 ml
	Attendre 5 minutes	
Acide chlorhydrique 0,1 N	2 ml	2 ml
Réactif ferrique	2 ml	2 ml

Lire à 540 nm après 10 mn exactement en raison de l'instabilité du complexe formé.

Technique de SNELL (30).

Réactifs.

- Réactif A, à base d'hydroxylamine, obtenu après mélange,
  - d'un volume d'une solution aqueuse de chlorhydrate d'hydroxylamine à 35 pour cent
  - d'un volume d'une solution aqueuse de lessive de soude à 17,7 pour cent, contenant 2 g pour cent d'acétate de sodium (CH_3 COONa, 3 H_2O)
  - 4 volumes d'alcool à 95°.
- Réactif B ferrique :
  - sulfate ferrique ammoniacal Fe_2 $(SO_4)_3$, $(NH_4)_2$ SO_4, 24 H_2O 100 g
  - acide sufurique concentré 46,7 ml
  - eau bidistillée q.s.p. 500 ml

Mode opératoire.

A 1 ml d'échantillon à doser, on ajoute 3 ml de réactif A. Agiter. Laisser reposer 3 mn, puis ajouter 1 ml de réactif B. Agiter. Laisser reposer entre 2 et 5 mn, puis lire à 515 nm contre un blanc réactif obtenu en remplaçant l'échantillon à doser par 1 ml d'eau distillée.

Après addition des deux réactifs, une agitation vigoureuse est nécessaire. L'addition du réactif ferrique entraîne la formation d'un trouble brun qui se solubilise après agitation. La lecture au spectrophotomètre doit être réalisée dans les 5 mn qui suivent l'addition du réactif B en raison de l'instabilité du complexe formé.

Comparaison des méthodes de FORD (9) et SNELL (30).

1. Instabilité du complexe formé.

Cette remarque est exposée par FORD qui indique l'évolution de l'intensité colorée du complexe dans le temps. Ses résultats sont les suivants :

Temps en mn après addition du réactif ferrique	*Intensité relative du complexe*
2	100
4	78
6	69
10	56

SNELL propose que la lecture soit réalisée dans les 5 mn mais même dans ces conditions, on observe une perte sensible d'intensité colorée. En fonction des valeurs fournies par FORD, il semble que le meilleur délai de lecture soit au minimum de 2 mn et au maximum de 3 mn si l'on veut bénéficier du maximum de sensibilité.

2. Composition du réactif ferrique. Nature du sel ferrique utilisé.

FORD utilise le chlorure ferrique à 10 pour cent en solution chlorhydrique 0,1 N.

SNELL utilise l'alun ferrique ou sulfate ferrique ammoniacal.

L'emploi de l'alun ferrique est plus séduisant que celui du $FeCl_3$ en raison de la grande instabilité des solutions de ce dernier.

Nous avons testé d'autres sels que l'alun pour éviter l'utilisation d'un sel ferrique de structure mixte.

Le sulfate ferrique en solution sulfurique. Nous n'avons pas pourquivi cette utilisation en raison de difficultés de solubilisation à des concentrations relatives en Fe^{3+} comparables à celles utilisées avec l'alun.

Le nitrate ferrique en solution nitrique conduit aux mêmes observations.

Dans ces deux cas, les solutions ferriques obtenues entraînaient une perte de sensibilité non négligeable.

Le citrate ferrique : là encore, il y a perte de la sensibilité.

De plus, cet essai nécessite la solubilisation de grandes quantités de sel ferrique. Les solutions obtenues, de coloration brun foncé, entraînaient une augmentation de l'intensité colorée du mélange réactionnel de base : prélèvement + réactif A + réactif B, ce qui au contraire doit être évité.

Il semble donc préférable d'utiliser comme SNELL l'alun ferrique.

3. Composition du réactif à l'hydroxylamine.

La concentration en hydroxylamine est sensiblement la même, mais SNELL introduit l'alcool à 95c dans la composition de son réactif. Nous reviendrons ultérieurement sur le rôle de ce solvant lors de la discussion relative à la technique autoanalytique sensibilisée.

-:-

ADAPTATION A L'AUTOANALYSE DE LA TECHNIQUE DE SNELL

Dans une première étape, nous avons orienté nos travaux vers l'automation de la technique de SNELL. Les réactifs utilisés sont ceux décrits par cet auteur, précédemment cités :

Matériel.

La chaîne Technicon utilisée comprend un distributeur type Sampler II, une pompe proportionnante de type P1, un colorimètre équipé de filtres interférentiels à 505 nm et d'une cuve à circulation continue de 1,5 cm, un enregistreur. A ce matériel Technicon est joint un bain-marie à circulation réglé à 37°.

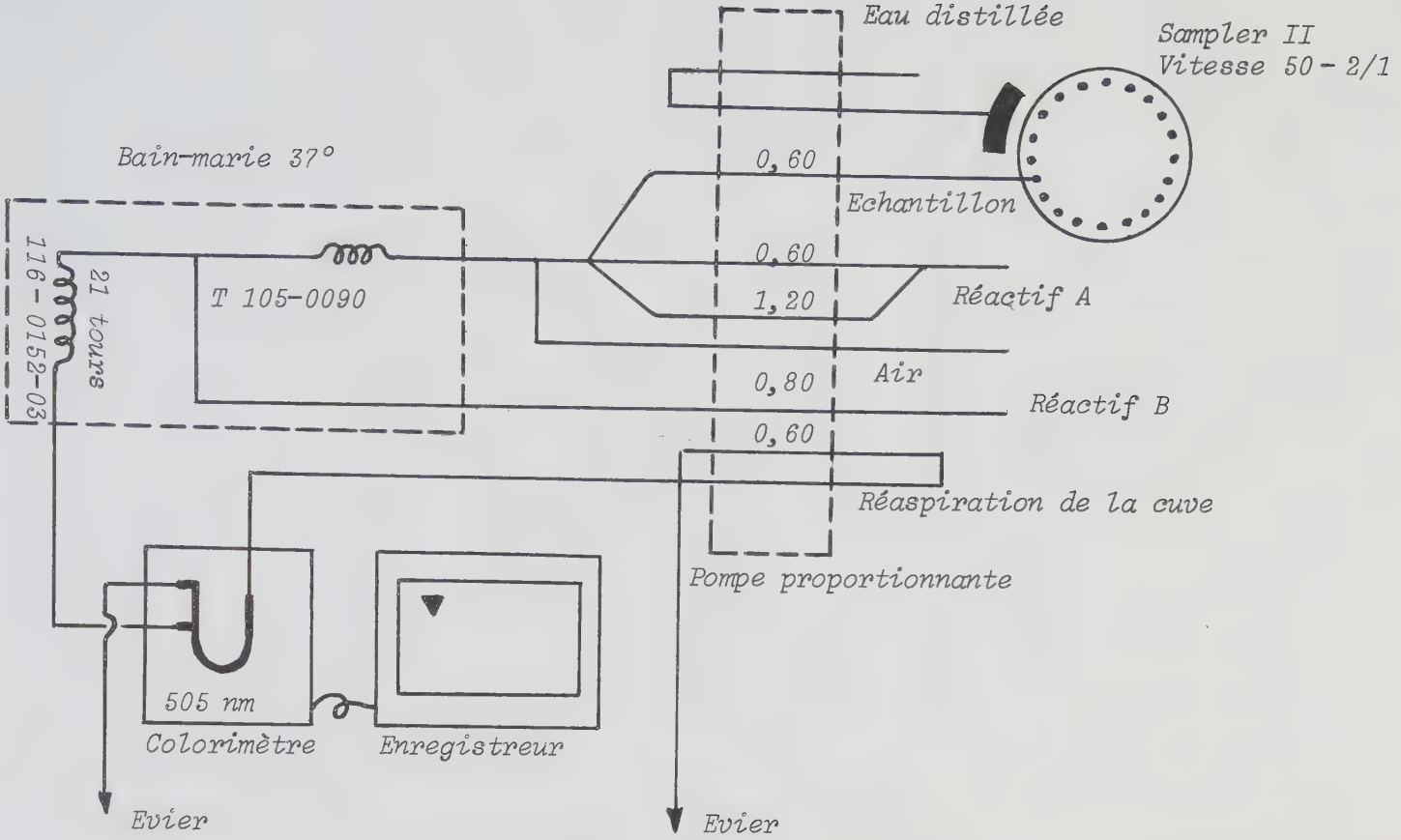
Montage du Manifold Diagramme des flux (Fig. n° 3).

Les tubes utilisés sont de type Clear-tygon.

Les échantillons sont distribués à la vitesse de 50 à 1'heure, le Sampler II étant équipé d'une came 50 - 2 / 1. Le prélèvement est réalisé par un tube de débit 0,60.

Le réactif A est distribué par deux tubes, 1'un de débit 0,60, 1'autre de débit 1,20. Le mélange (prélèvement-réactif A) est réalisé dans un mélangeur de type T 105 - 0090. La segmentation par air est réalisée à 1'entrée du mélangeur. L'air est distribué par un tube de débit 0,80.

Figure n° 3 - MONTAGE DU MANIFOLD



Le mélange est réalisé à 37° ainsi que l'ensemble des opérations ultérieures.

Il est mis en contact avec le réactif ferrique dans un mélangeur représenté par une bobine de grand diamètre type "hématologie" constituée de 21 spires (116 - 0152 - 03) qui correspond à un délai de 3 mn.

La bobine est placée dans le bain-marie à 37°. A la sortie, le mélange réactionnel est dirigé vers le colorimètre. La figure n° 3 représente le montage utilisé.

Le bac de rinçage du Sampler II est alimenté par de l'eau distillée.

Résultats.

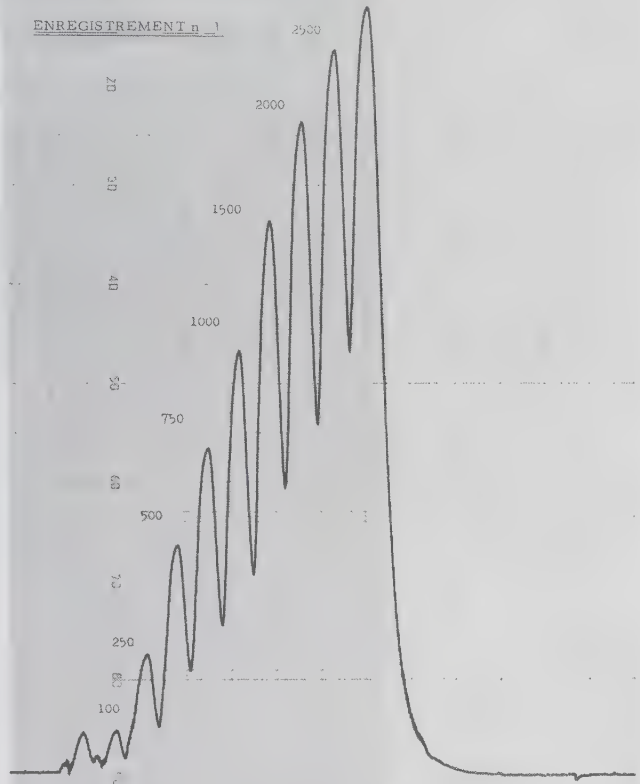
La technique a été appliquée au dosage des β lactamines suivantes : Benzylpénicilline, Ampicilline, Métampicilline, Oxacilline, Méthicilline, Carbénicilline, Hétacilline, Cloxacilline, Céphaloridine, Céphalotine. Les solutions étalons sont réalisées en eau bidistillée : solutions à 5 mg/ml, diluées de façon à réaliser des étalons compris entre 100 et 3000 µg/ml.

L'enregistrement n° 1 représente l'étalonnage des solutions de benzylpénicilline comprises entre 100 et 3000 µg/ml.

La coloration du complexe formé obéit à la loi de Beer-Lambert sur toute l'échelle de sensibilité et ceci, indépendamment de la nature des β lactamines.

COURBE D'ETALONNAGE DE LA BENZYLPENICILLINE

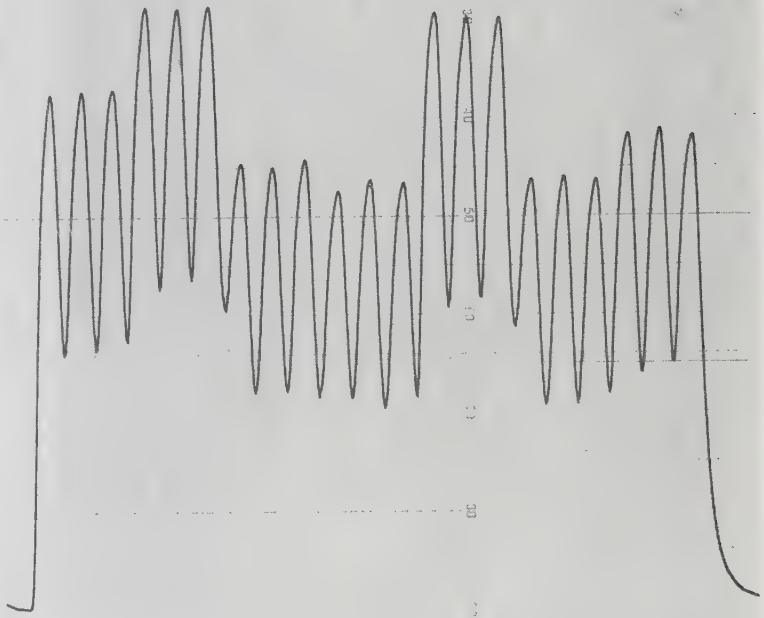
ENREGISTREMENT n 1



ENREGISTREMENT n 2

REPRODUCTIBILITE DES RESULTATS

Série n° II



Justifications de la méthode.

1. Etude de sa sensibilité.

Cette technique permet de différencier deux pics correspondant à des concentrations voisines de 10 µg/ml, soit 0,028 micromole de benzylpénicilline. Cette différence correspond à 0,5 pour cent de transmission. Le seuil de sensibilité est de l'ordre de 25 µg/ml.

2. Etude de la reproductibilité des résultats.

Au cours d'une expérimentation nous avons testé deux séries identiques de dosages, chaque échantillon étant placé en triple. Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau suivant. Les concentrations des différentes pénicillines sont exprimées en µg/ml.

(Enregistrement n° 2)

Séries	*Série n° 1*			*Série n° 2*		
N° des pics	1	2	3	1	2	3
Benzylpénicilline	1320	1325	1350	1350	1375	1375
Ampicilline	1325	1330	1350	1375	1350	1375
Métampicilline	1275	1275	1275	1320	1300	1350
Méthicilline	1375	1400	1400	1375	1430	1420
Céphalosporine	1300	1300	1250	1350	1325	1325
Oxacilline	1150	1175	1150	1225	1225	1225
Carbénicilline	1360	1325	1350	1360	1375	1350

3. Contrôle de l'activité d'une pénicilline étalon.

Le Neutrapen titré à 400 000 Unités/ml, fourni par les Laboratoires CALBIOCHEM, référence n° 5163-31, lot n° 11.495.

Une unité de pénicillinase est capable d'hydrolyser, par minute, une unité de benzylpénicilline à la température de 25°, à pH 7.

80 unités de pénicilline et 4800 unités de benzylpénicilline ont été mises en contact pendant 1 heure à 25°.

	Témoin	*Dosage*
Solution de Benzylpénicilline à 2400 U/ml	2 ml	2 ml
Solution de pénicillinase à 40 U/ml	0	2 ml
Eau distillée	2 ml	0

Après ce temps la moitié de la benzylpénicilline, mesurée comparativement au témoin, a disparu, soit 600 Unités/ml, ce qui correspond à une consommation de 10 U/ml par minute. Tenant compte de la dilution finale au 1/40.000 ème, le titre de la pénicillinase est de 400 000 Unités/ml.

4. Comparaison avec la méthode à l'iode.

Nous avons utilisé la méthode classique de PERRET. Nous comparons les résultats fournis par les deux méthodes :

- quantité d'acide pénicilloïque apparu
- quantité de pénicilline hydrolysée

au cours d'une expérimentation portant sur la Klebsiella 418.

Temps	*Hydroxylamine*	*Iodométrie*
	Pénicilline hydrolysée en micromoles	Acide pénicilloïque apparu, en micromoles
1/2 H.	22,5	23,8
1 H.	33	36
1 H. 30	43,2	45,7
2 H. 15	64	67
2 H. 30	67	70,5

Nous reviendrons sur cette comparaison lors de la discussion.

Discussion.

1. Les aménagements techniques.

Le rôle du bain-marie semble primordial pour assurer un parfait mélange des réactifs de densités différentes. Le développement des microbulles formées lors du mélange eau-alcool se trouve considérablement atténué.

Le bain-marie évite les précipités inhérents au mélange des réactifs A et B, décrits par NIEDERMEYER (21), qui, pour les éliminer utilisait une connection en T. Ainsi la ligne de base est parfaitement stable et l'absorption du complexe est maximale.

La détection colorimétrique du complexe doit être effectuée en moins de 3 mn alors qu'à température ordinaire, ce délai est de 5 mn.

Ceci implique que les agents réactionnels soient mélangés de façon suffisante en moins de 3 mn. Cette condition se trouve réalisée par l'emploi de la bobine de mélange précédemment citée.

2. Comparaison avec la méthode iodométrique.

La méthode iodométrique permet de déterminer l'acide pénicilloïque apparu. La comparaison avec notre méthode permet de dire que la quantité de pénicilline disparue est transformée en acide pénicilloïque malgré un léger écart dû à des consommations d'iode non spécifiques, comme l'ont signalé divers auteurs (18).

Ainsi notre méthode se prête à une étude directe des β lactamases.

3. Seuil de sensibilité.

Bien que notre adaptation présente une bonne reproductibilité, elle ne permet pas de déterminer des concentrations inférieures à 50 µg/ml. Elle est donc assez éloignée des méthodes microiodométriques plus sensibles, très utilisées pour l'étude des β lactamases.

Pour ces raisons, nous avons poursuivi nos travaux dans le sens de la sensibilisation afin d'obtenir une sensibilité comparable.

-:-

SENSIBILISATION DE LA TECHNIQUE PRECEDENTE

Cette sensibilisation a été réalisée en deux temps :

Première étape.

.Modification du montage du manifold portant sur les volumes des différents réactifs.

.Modification de la composition des réactifs.

Deuxième étape.

.Modifications portant sur la détection colorimétrique = cuve à circulation continue de 5cm et expansion d'échelle sur l'enregistreur.

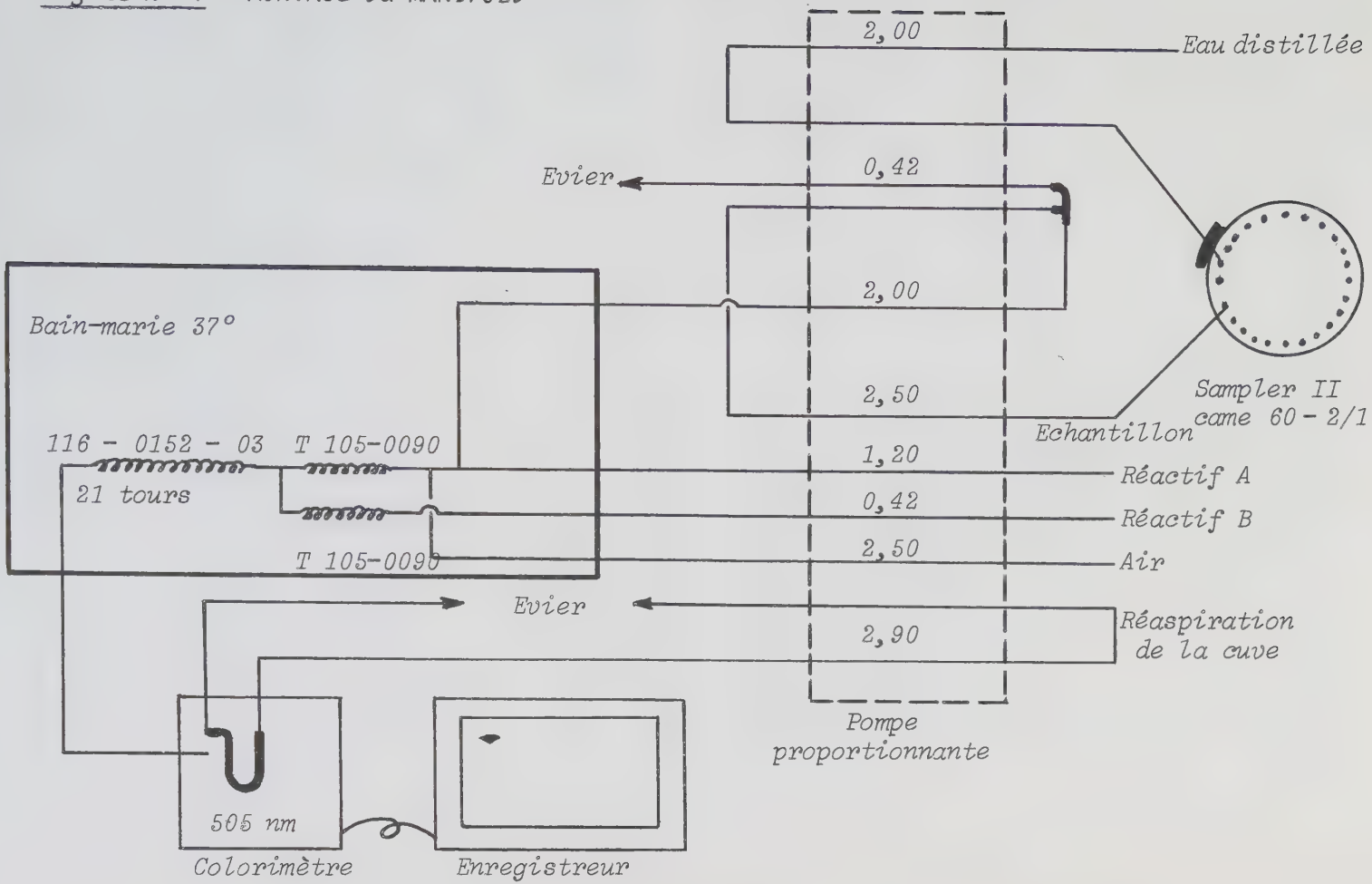
Matériel.

Le matériel utilisé est le même que dans la technique précédente. Les seules modifications portent sur le colorimètre qui peut être équipé soit d'une cuve de 1,5 cm, soit d'une cuve de 5 cm, et sur l'enregistreur qui est muni d'un système d'expansion d'échelle suivant les besoins.

Diagramme des flux - Montage du Manifold (Fig. n° 4).

Les tubes utilisés sont de type Clear-tygon.

Figure n° 4 - MONTAGE DU MANIFOLD



L'échantillon distribué par le Sampler II est prélevé par un tube de débit 2,50. Le volume nécessaire à la réaction est réaspiré par un tube de débit 2,00. L'excès de liquide est éliminé par un débulleur relié à un tube de débit 0,42. Ce dispositif permet l'élimination des bulles d'air formées lors des mouvements du préleveur entre les godets d'échantillons et le bac de rinçage.

La formation d'acide hydroxamique est réalisée dans une petite bobine de mélange par mise en contact de l'échantillon avec le réactif à base d'hydroxylamine. La segmentation par l'air se fait à ce niveau.

Ce mélange réactionnel est ensuite mis en contact avec le réactif ferrique préalablement équilibré à 37° par passage dans une bobine de mélange (Réf. T 105.0090)placée dans le bain-marie à 37°. La formation d'hydroxamates ferriques est réalisée dans le mélangeur correspondant à un délai de 3 mn décrit dans le chapitre précédent (Réf. 116-0152-03). Le mélange final est dirigé vers le colorimètre équipé de filtres interférentiels à 505 nm.

En fonction du volume d'échantillon prélevé, le Sampler II est équipé d'une came 60-2/1. Pour réaliser une excellente séparation des pics enregistrés, les échantillons seront séparés par un godet d'eau.

Composition des réactifs.

Réactif A :

Il est obtenu par mélange des solutions suivantes :

- un volume d'une solution aqueuse de chlorhydrate d'hydroxylamine à 35 pour cent
- un volume d'une solution de lessive de soude à 17,7 ml pour cent dans l'eau distillée contenant 2 g d'acétate de sodium (CH_3COONa, 3 H_2O)
- 4 volumes d'eau bidistillée.

Après mélange des différentes solutions, ce réactif est additionné de Brij 35 dans la proportion de 1 ml pour 1000 ml.

Réactif B :

Sa composition est la suivante :

- sulfate ferrique ammoniacal (alun ferrique) $Fe_2 (SO_4)_3$, $(NH_4)_2 SO_4$, 24 H_2O : 200 g
- acide sulfurique RP, densité 1,83 : 46,7 ml
- eau distillée q.s.p. : 500 ml.

Ce réactif est obtenu par addition de l'acide sulfurique à l'alun ferrique. Après mélange, bien que le sel ne soit pas encore totalement dissout, on ajoute avec précaution l'eau distillée en complétant à 500 ml.

Les réactions seront réalisées avec des produits chimiques extrêmement purs pour éviter la formation d'un précipité à l'entrée de la bobine de mélange après introduction du réactif ferrique.

Ce précipité, dû probablement à la présence d'alcalino-terreux : impuretés des produits chimiques, peut être facilement éliminé par addition d'E.D.T.A. dans le réactif A. On remplace les 4 volumes d'eau bidistillée par 4 volumes d'une solution aqueuse d'E.D.T.A. à 10 p. 1000. Cette modification ne perturbe pas la formation du complexe coloré.

Justification de la méthode.

1. Analyse statistique.

Nous avons réalisé deux études statistiques en fonction des dispositifs techniques suivants :

- cuve de 1,5 cm, sans expansion d'échelle,
- cuve de 5 cm, avec expansion d'échelle.

Les deux études ont été réalisées de la même façon à l'aide de la Benzylpénicilline. Pour chaque étude nous avons réalisé trois séries de 30 échantillons correspondants à des zones de concentrations différentes :

1ère étude série I 90 µg/ml
série II 250 µg/ml
série III 500 µg/ml (enregistrement n° 3)

2ème étude série I 10 µg/ml (enregistrement n° 4)
série II 50 µg/ml (enregistrement n° 5)
série III 75 µg/ml (enregistrement n° 6).

On sait, grâce à la théorie de l'estimation d'une espérance mathématique (moyenne), estimer la valeur exate de µ par son estimation $\hat{\mu}$ et calculer l'intervalle de confiance de µ au niveau $1 - \alpha$ par la formule :

$$\left] \hat{\mu} - t\left(n-1, \frac{\alpha}{2}\right) \sqrt{\frac{\hat{v}}{n}}, \hat{\mu} + t\left(n-1, \frac{\alpha}{2}\right) \sqrt{\frac{\hat{v}}{n}} \right[$$

ou $\hat{v}$ estimation de la variance $v = \dfrac{\Sigma (x - \hat{\mu})^2}{n - 1}$

$\hat{\mu}$ estimation de la moyenne = $\Sigma \dfrac{x}{n}$

n nombre de dosages dans chaque série

$t\left(n-1, \frac{\alpha}{2}\right)$ représente le nombre de la probabilité α d'être dépassé en module pour une loi de probabilité de STUDENT FISCHER à n - 1 degrés de liberté.

Les résultats sont représentés dans les tableaux n° 3 et 4. Les enregistrements n° 3, 4, 5, 6 représentent les enregistrements correspondants à ces études statistiques.

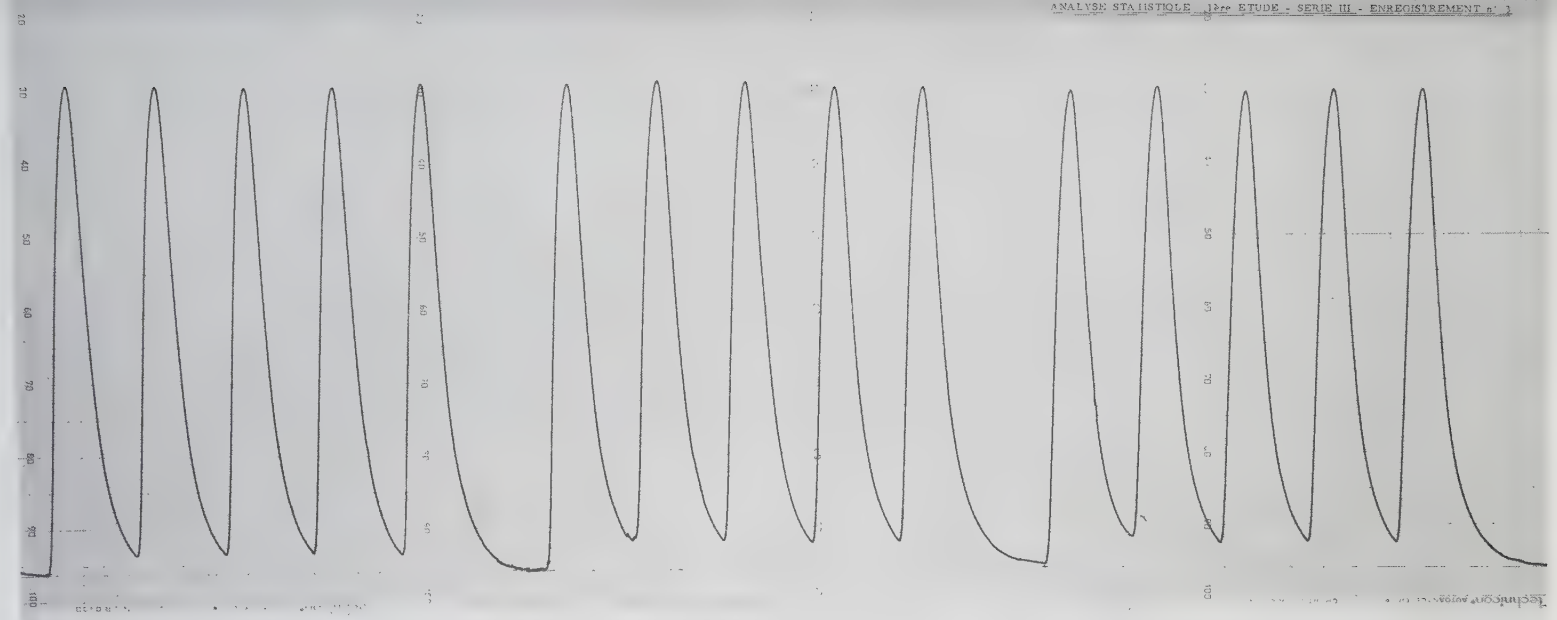
Dosage n°	Série I × (µg/ml)	Série II × (µg/ml)	Série III × (µg/ml)
1	9	24	49, 5
2	10, 5	24	50
3	9	24	49, 25
4	10	24, 5	49, 5
5	10	25	50
6	10, 5	25	50
7	9, 5	24, 5	50
8	10	25	50, 5
9	10	24, 5	50, 5
10	9, 5	25	51
11	10	25	50
12	10	24, 5	50
13	10	25	49, 75
14	10	24, 5	50, 5
15	10	25	49, 5
16	10	25	49, 5
17	10	24, 5	49, 5
18	10	25	50
19	10	25, 5	50
20	10	25	50, 5
21	11	25	50
22	10	25, 5	51
23	10	24, 5	49, 25
24	10	25	49, 50
25	10	25	49, 5
26	10	25	50
27	10	25	49
28	10	25	50
29	10	25	50
30	10	25, 5	50
Moyenne estimée $\hat{\mu}$	9, 96 µg/ml	24, 83 µg/ml	42, 92 µg/ml
Variance estimée $\sigma^2 = \hat{v} = \frac{\Sigma (\times \hat{\mu})^2}{29}$	0, 13	0, 096	0, 26
Coefficient de variation C.V. $= \frac{100\ \sigma^2}{\mu}$	3, 6 %	1, 25 %	1, 04 %
$t\sqrt{\frac{\hat{v}}{30}}$ Niveau 0, 95	0, 14 µg/ml	0, 12 µg/ml	0, 19 µg/ml
$t\sqrt{\frac{\hat{v}}{30}}$ Niveau 0, 99	0, 18 µg/ml	0, 16 µg/ml	0, 26 µg/ml
Intervalle de confiance Niveau 0, 95	0, 28 µg/ml	0, 24 µg/ml	0, 38 µg/ml
Intervalle de confiance Niveau 0, 99	0, 36 µg/ml	0, 32 µg/ml	0, 52 µg/ml

TABLEAU n° 3 - 1ère étude statistique. Coefficient de variation. Intervalle de confiance.

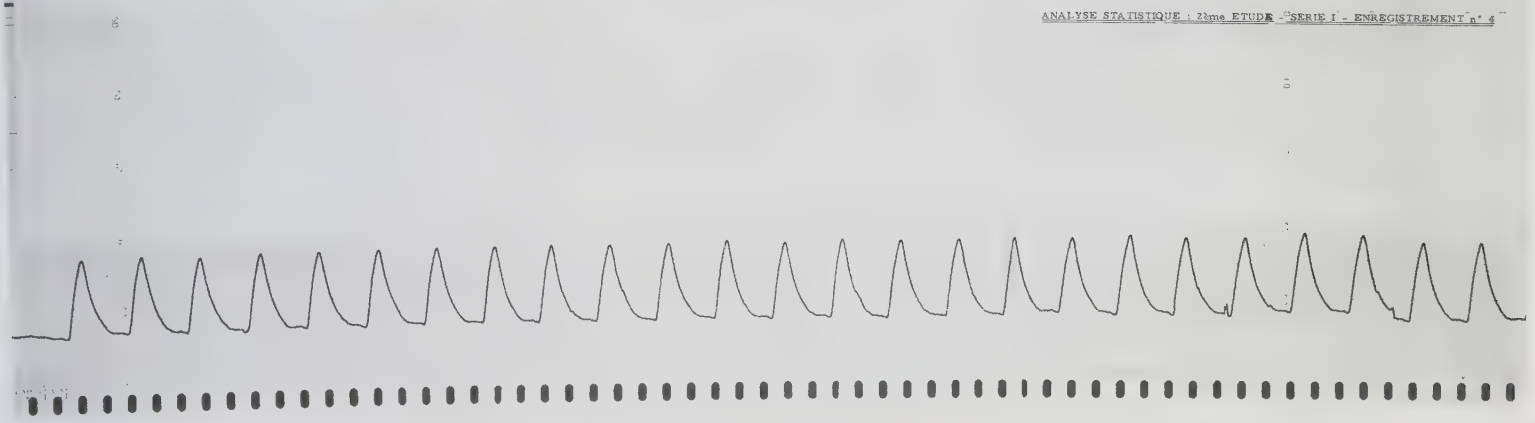
Dosage n°	Série I × (µg/ml)	Série II × (µg/ml)	Série III × (µg/ml)
1	90, 0	241	480
2	86, 0	242	475
3	86, 0	242	473
4	85, 0	245	473
5	85, 0	246	476
6	88, 0	247	486
7	88, 0	247	482
8	87, 0	248	485
9	87, 0	247	486
10	88, 0	252	486
11	89, 0	252	485
12	87, 5	248	487
13	88, 0	248	481
14	88, 0	254	482
15	88, 0	242	484
16	87, 5	245	482
17	87, 5	244	480
18	88, 0	250	478
19	86, 0	250	478
20	86, 0	243	482
21	87, 5	243	481
22	90, 0	251	487
23	88, 5	252	483
24	90, 0	248	472
25	91, 0	249	471
26	90, 0	250	465
27	90, 0	252	472
28	90, 0	253	463
29	90, 0	249	467
30	91, 0	252	468
oyenne estimée $\hat{\mu}$	88, 0 µg/ml	248 µg/ml	478 µg/ml
ariance estimée : $= \hat{\nu} = \frac{\Sigma (\times \hat{\mu})^2}{29}$	2, 90	14	48
oefficient de variation V. $\frac{100\ \sigma}{\hat{\mu}}$	1, 8 %	1, 5 %	1, 4 %
$\sqrt{\frac{\hat{\nu}}{30}}$ Niveau 0, 95	0, 7 µg/ml	1, 4 µg/ml	2, 6µg/ml
$\sqrt{\frac{\hat{\nu}}{30}}$ Niveau 0, 99	0, 9 µg/ml	1, 9 µg/ml	3, 5µg/ml
tervalle confiance Niveau 0, 95	1, 4 µg/ml	2, 8 µg/ml	5, 2µg/ml
tervalle confiance Niveau 0, 99	1, 8 µg/ml	3, 8 µg/ml	7, 0µg/ml

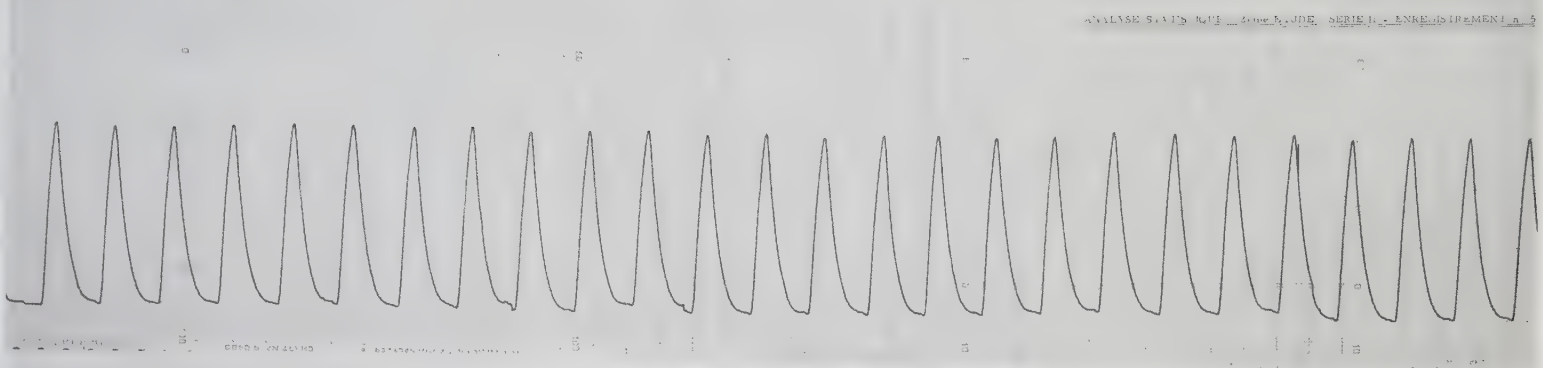
LEAU n° 4 - 2ème étude statistique. Coefficient de variation. Intervalle de confiance

ANALYSE STATISTIQUE : 1ère ETUDE - SERIE III - ENREGISTREMENT n° 1

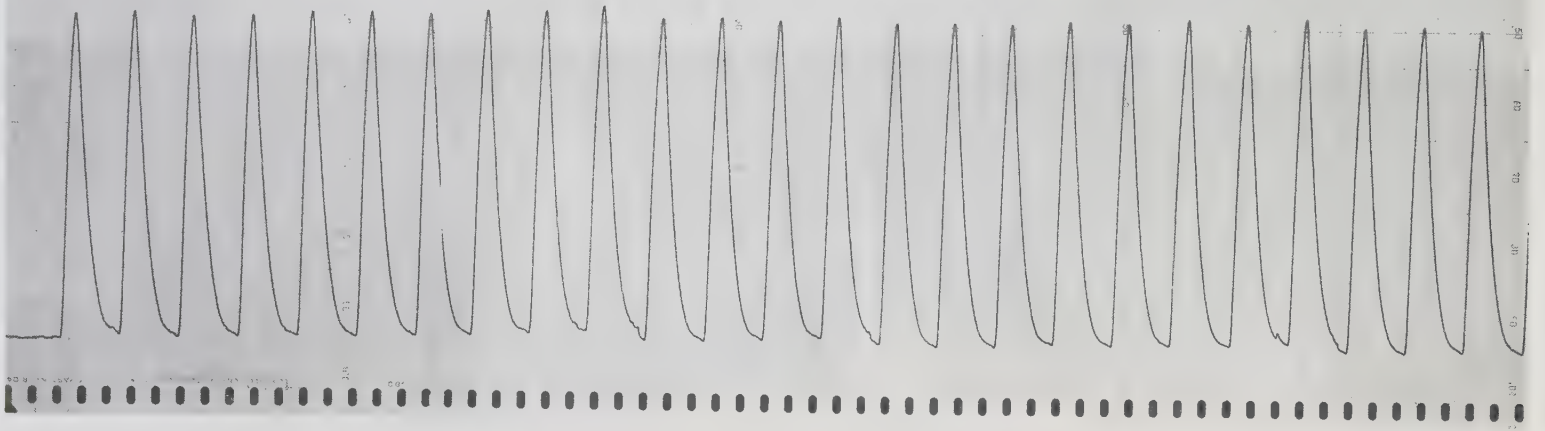


ANALYSE STATISTIQUE : 2ème ETUDE - SERIE I - ENREGISTREMENT n° 4





ANALYSE STATISTIQUE . 2ème ETUDE - ENREGISTREMENT n° 5



2. Comparaison avec la méthode microbiologique.

Par la méthode microbiologique, la détermination des concentrations de β lactamines consiste à mesurer en milieu solide les diamètres d'inhibition d'une culture bactérienne sensible, en l'occurence le germe Sarcina lutea ATCC 9341, selon la technique de CHABERT et BOULINGRE (5).

Méthode en double couche (PENASSAY Difco 1 et 2). La gamme étalon et les dilutions à doser sont réalisées en tampon pH 6 (Merck).

La technique à l'hydroxylamine, s'adressant à la fonction β lactame, et non aux produits de dégradation des pénicillines, concorde parfaitement avec la méthode microbiologique et peut par conséquent être utilisée comme moyen de contrôle d'activité des β lactamines.

Nous donnons deux exemples :

- *Comparaison entre le dosage automatique à l'hydroxylamine et le dosage microbiologique* de l'ampicilline (Fig. n° 5).

Hydrolyse de l'ampicilline par une pénicilline de Bacillus cereus.

On peut noter sur la courbe l'excellente concordance des deux techniques, surtout si l'on sait que la méthode microbiologique, très sensible, donne une dispersion des résultats de l'ordre de plus ou moins 15 pour cent.

Temps	Ampicilline hydrolysée	
	Automation	Microbiologie
15 mn	150 µg/ml	170 µg/ml
30	250	280
45	350	400
60	550	570
75	850	850

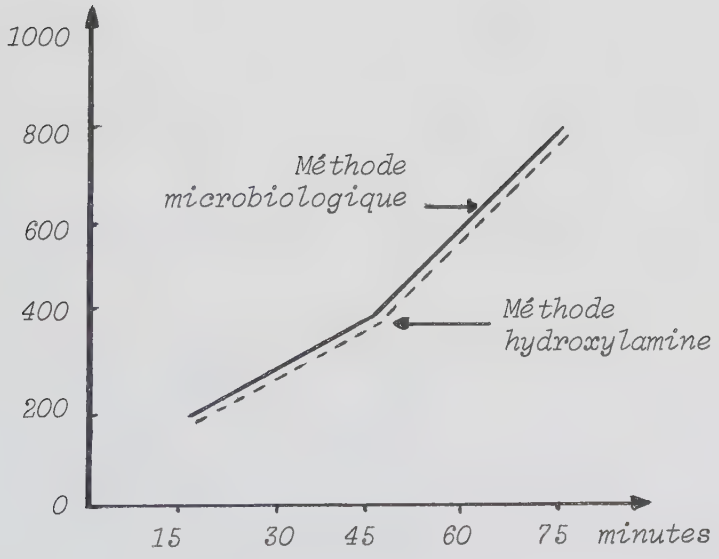


Figure n° 5

- *Contrôle d'un échantillon commercial de Métampicilline.*

Nous avons reçu à des fins d'expérimentation un échantillon de Métampicilline qui, par comparaison à d'autres lots, présentait une très faible activité antibiotique.

La comparaison de l'activité de ces deux lots par notre technique à l'hydroxylamine et par la technique microbiologique est donnée dans la figure n° 6.

Nous voyons que par la méthode microbiologique le lot de Métampicilline incriminé est 5 fois moins actif que le lot témoin. Par la méthode à l'hydroxylamine, l'on dose six fois moins d'antibiotique dans le lot de faible activité que dans le lot témoin. Là encore, la concordance nous paraît excellente car elle se situe dans la dispersion normale des résultats de la méthode microbiologique.

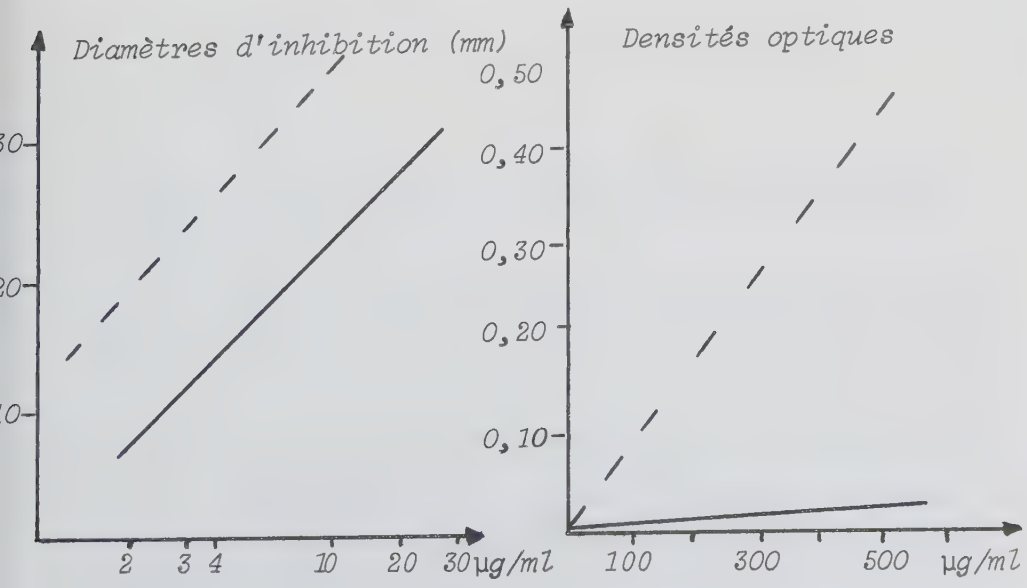


Figure n° 6

Résultats.

La technique permet de déterminer une concentration de 1 µg/ml de benzyl pénicilline.

La méthode de SNELL, dans les meilleures conditions opératoires, permet de déterminer 50µg/ml de benzylpénicilline.

Les diverses étapes de perfectionnement ont donc permis d'obtenir une méthode 50 fois plus sensible. Chaque étape peut être affectée d'un coefficient de sensibilisation.

Modification de la composition des réactifs et des rapports de volumes entre échantillon et réactifs.

Cette étape permet de déterminer 10 µg/ml de benzylpénicilline = coefficient de sensibilisation égal à 5.

Enregistrement n° 7 : concentrations comprises entre 10 et 750 µg/ml.

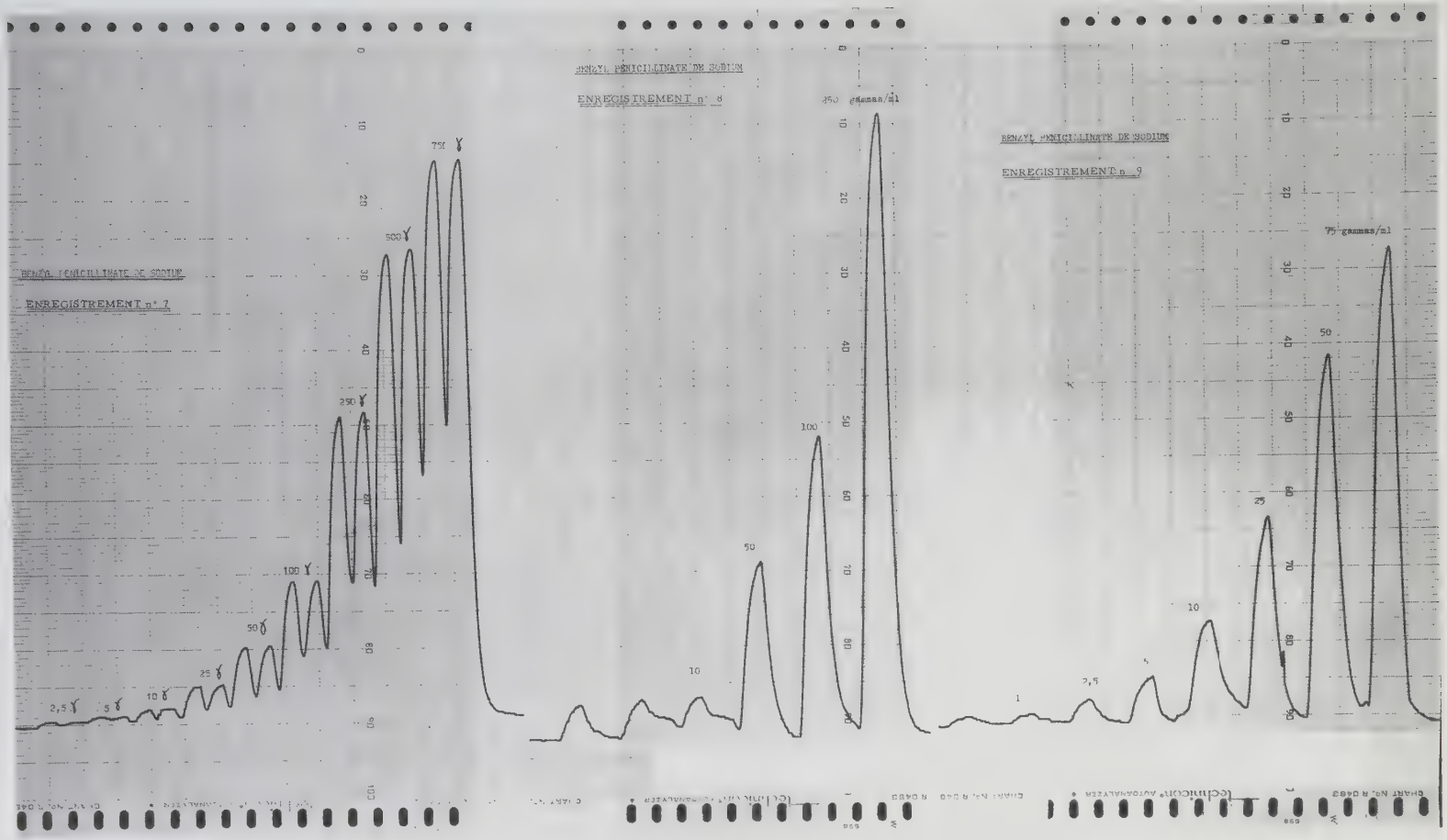
Utilisation d'une cuve de 5 cm de parcours optique.

Cette adaptation permet de déterminer 2,5 µg/ml de bensylpénicilline = coefficient de sensibilisation égal à 4.

Enregistrement n° 8 : concentrations comprises entre 2,5 et 250 µg/ml.

Utilisation du système d'expansion d'échelle.

Cette adaptation permet de déterminer 1 µg/ml de benzylpénicilline, coefficient de sensibilisation égal à 2,5.


BENZYL PENICILLINATE DE SODIUM
ENREGISTREMENT n° 7
2,5 γ
5 γ
10 γ
25 γ
50 γ
100 γ
250 γ
500 γ
750 γ
BENZYL PENICILLINATE DE SODIUM
ENREGISTREMENT n° 8
250 gammas/ml
100
50
10
BENZYL PENICILLINATE DE SODIUM
ENREGISTREMENT n° 9
75 gammas/ml
50
10
2,5
1

Enregistrement n° 9 : concentrations comprises entre 1 et 100 µg/ml.

Le produit des coefficients est égal à 50.

Cette technique a été appliquée à la détermination de la plupart des β lactamines : enregistrements n° 10 à 22. Les différences de sensibilité obtenues avec chacune d'elles sont inhérentes aux différences de structure comme nous le verrons ultérieurement (Figure 8).

Discussion.

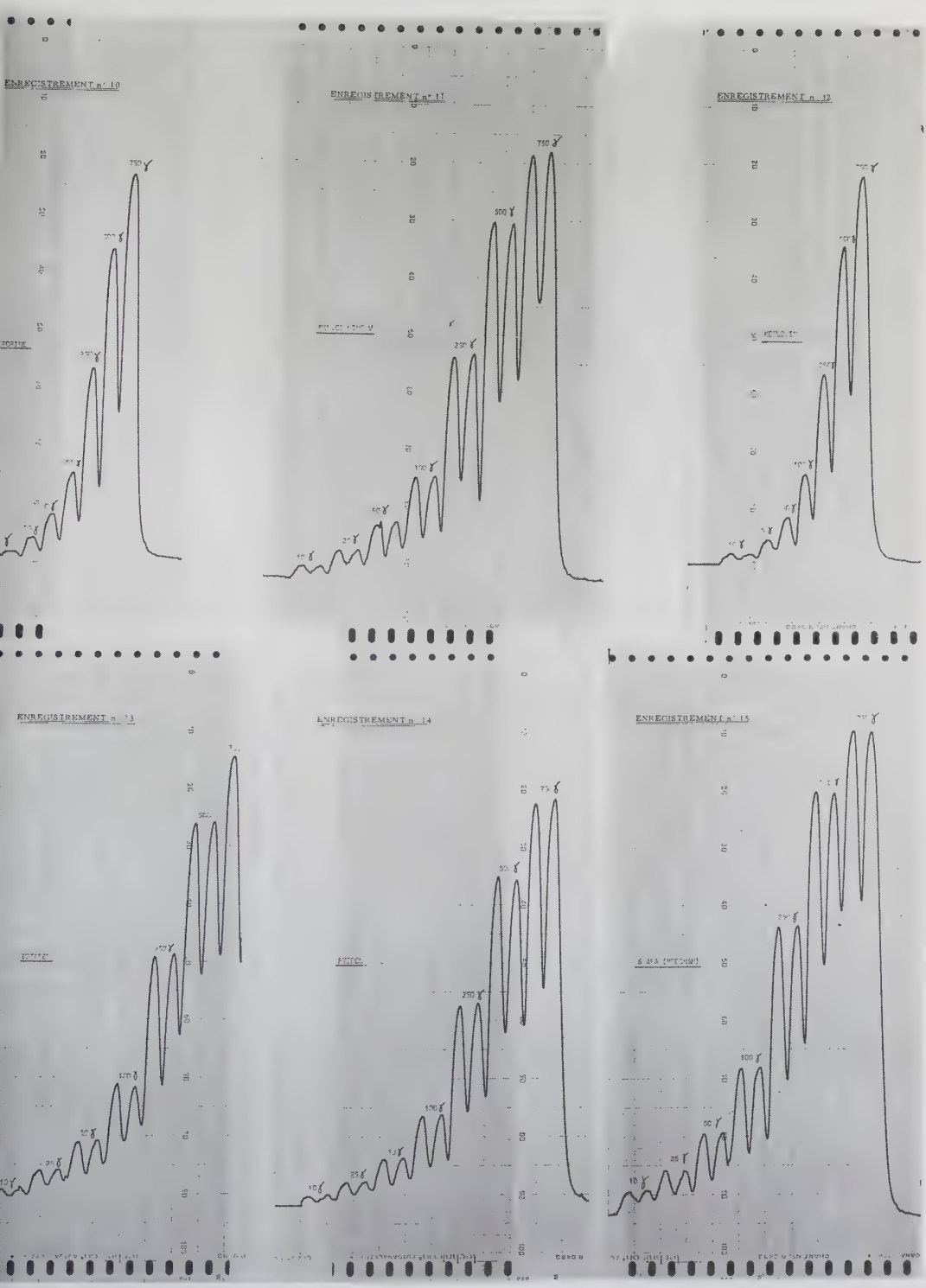
1. Aménagements techniques.

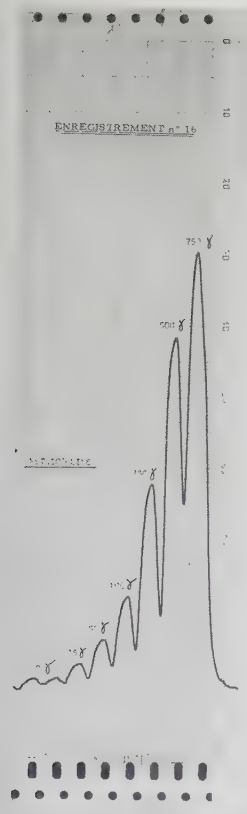
Par rapport à la première adaptation autoanalytique, la différence importante qui existe entre les deux manifolds est localisée au niveau du prélèvement.

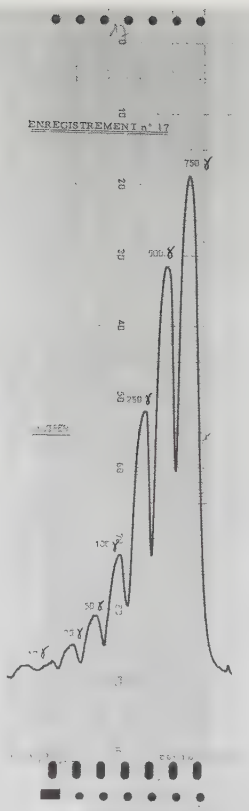
En effet, l'échantillon est prélevé par un tube de débit 2,50, alors que, dans la première adaptation, il n'est prélevé que sous un débit 0,60. Il s'ensuit qu'entre les échantillons, la bulle d'air formée lors des mouvements du préleveur est beaucoup plus importante (volume), au point de perturber le mélange réactionnel final, si on ne la retire pas du circuit.

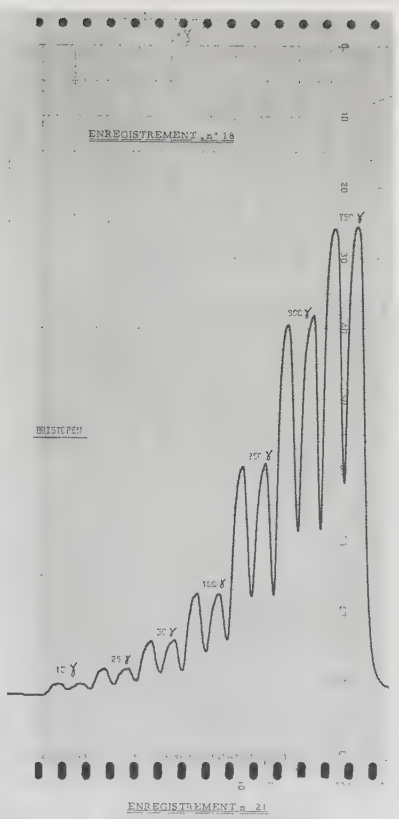
La présence d'air excédentaire dans le circuit entraîne une augmentation de l'intensité colorée du mélange réactionnel par suite de la coloration du réactif B.

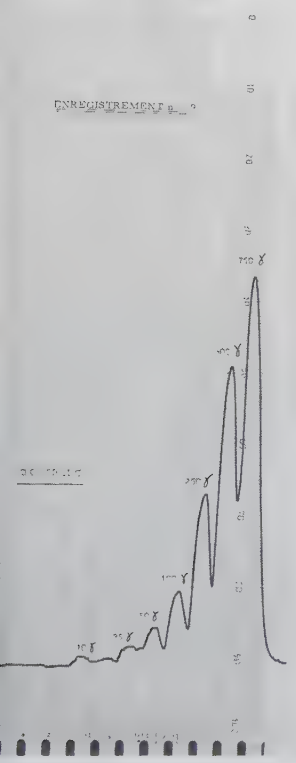
L'élimination nécessaire de cette bulle d'air est réalisée au niveau d'un débulleur placé sur le circuit de prélèvement des échantillons.

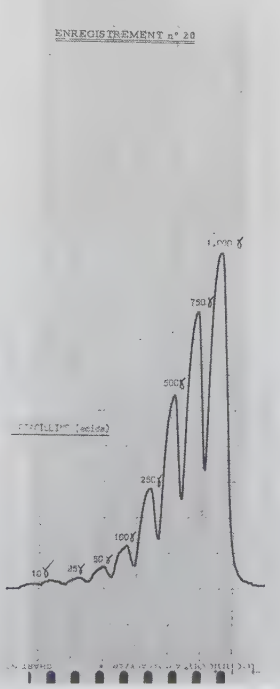

ENREGISTREMENT n° 10
ENREGISTREMENT n° 11
ENREGISTREMENT n° 12
ENREGISTREMENT n° 13
ENREGISTREMENT n° 14
ENREGISTREMENT n° 15

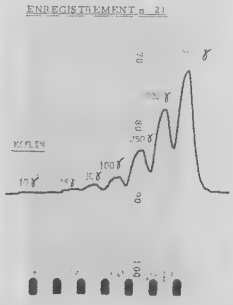

ENREGISTREMENT n° 16
750 γ
500 γ

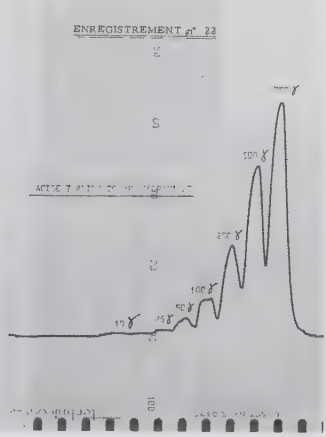

ENREGISTREMENT n° 17
750 γ
500 γ
250 γ
100 γ
50 γ

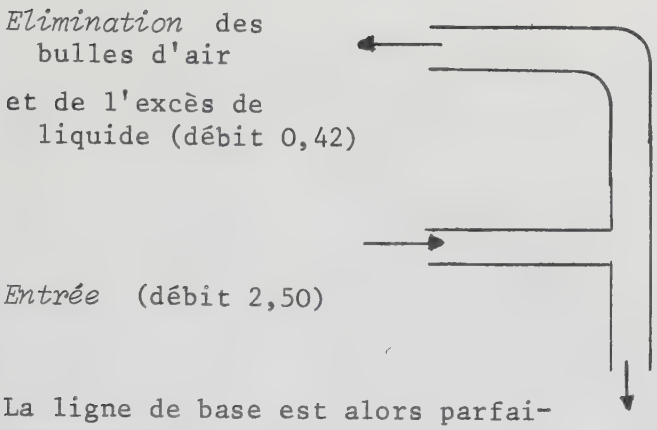

ENREGISTREMENT n° 18
BRISTOPEN
750 γ
500 γ
250 γ
100 γ
50 γ
25 γ
10 γ


750 γ
250 γ
100 γ
50 γ
25 γ
10 γ


ENREGISTREMENT n° 20
1,000 γ
750 γ
500 γ
250 γ
100 γ
50 γ
25 γ
10 γ


ENREGISTREMENT n° 21
KEFLIN
250 γ
100 γ
10 γ


ENREGISTREMENT n° 22
500 γ
250 γ
100 γ
50 γ
25 γ
10 γ



2. *Composition des réactifs.*

Réactif A.

Il a été démontré que l'intensité du complexe coloré est due à la réduction des ions Fe^{3+} par un excès d'hydroxylamine (3).

Nous avons utilisé de plus faibles concentrations d'hydroxylamine, mais nous avons noté une perte de sensibilité. La concentration proposée par SNELL (30) a donc été maintenue.

Par contre, nous avons supprimé l'alcool à 95c introduit par SNELL (30), et non utilisé par FORD (9).

Il semble que dans la méthode manuelle de SNELL, le solvant soit introduit afin de favoriser la solubilisation du précipité qui apparaît lors de la mise en contact des réactifs A et B. En effet, une agitation importante est nécessaire pour la réaliser.

En autoanalyse ces précipités sont également observés sous forme d'un dépôt à l'entrée de la bobine de mélange correspondant au délai de 3 mn.

Leur élimination peut être réalisée par addition d'EDTA dans le réactif A. Si l'on effectue les solutions à doser dans un tampon citraté pH 6, de la même façon, on observe la disparition des précipités.

L'emploi d'alcool, possible en méthode manuelle est très difficile en auto-analyse. En effet, on ne peut pas réaliser correctement le mélange des réactifs de densités différentes par une agitation violente. De plus, la formation de microbulles résultant du mélange eau-alcool perturbe la lecture photométrique.

Ces différents inconvénients peuvent être supprimés par l'emploi d'une solution aqueuse d'EDTA à 1 p. 100 à la place de l'alcool à 95°.

Réactif B.

Une augmentation de la concentration en sel ferrique sensibilise la méthode. Nous utilisons une concentration maximale en fer : 200 g d'alun pour 500 ml alors que SNELL utilisait une concentration de 100 g p. 500 ml.

3. Linéarité densités optiques-concentrations.

Dans les conditions opératoires classiques : cuve de 1,5 cm, la réaction colorée suit la loi de Beer Lambert sur toute l'échelle de concentrations. L'addition de l ' expansion d'échelle sur l'enregistreur n'entraîne aucune modification.

Il n'en est pas de même lorsqu'on utilise la cuve de 5 cm de parcours optique.

La linéarité n'est plus observée sur toute l'échelle des concentrations, mais on enregistre une courbe d'allure hyperbolique.

Cette modification demeure néanmoins constante comme le prouve la parfaite reproductibilité des pics enregistrés pour une même concentration (études statistiques. Enregistrements n° 4 - 5 - 6).

4. Sensibilisation de la détection colorimétrique.

Les modifications qui portent sur la composition des réactifs et sur le montage du Manifold permettent d'abaisser le seuil de sensibilité à 10 µg/ml. L'enregistrement n° 8 montre que des concentrations inférieures à 10 µg/ml peuvent être détectées.

La détermination d'une concentration de 2,5 µg/ml manque de précision mais cet enregistrement prouve que la formation d'hydroxamates ferriques, dans nos conditions opératoires, permet de déceler de très faibles concentrations.

L'emploi de la cuve de 5 cm et de l'expansion d'échelle permet une amplification des très faibles signaux optiques.

Cet emploi est donc justifiable.

-:-

COMPARAISON DE LA TECHNIQUE SENSIBILISEE AVEC LES METHODES MICROIODOMETRIQUES

Cette comparaison doit porter sur deux points essentiels :

- sensibilité et échelle de valeurs,
- interférences avec le substrat que l'on détermine.

SEUIL DE SENSIBILITE - AMPLITUDE DE SENSIBILITE.

Si l'on se rapporte au tableau comparatif des différentes méthodes (chapitre I, tableau n° 1), on constate que la technique proposée rejoint les méthodes microiodométriques (NOVICK (22), LINDSTROM (18)), ainsi que la méthode de SCUDI (29), qui sont capables de déterminer une concentration correspondant à 1 µg/ml de pénicilline.

Du point de vue amplitude de sensibilité, la technique que nous proposons offre un rapport de concentrations entre les faibles et les fortes valeurs que les méthodes microiodométriques sont incapables de fournir. En ce sens, elle en diffère donc. Nous pouvons, avec un même montage du Manifold, déterminer des concentrations comprises entre 1 et 100 µg/ml, ce qui correspond à un rapport de valeurs égal à 100.

La technique de LINSTROM (18) offre un rapport de valeur égal à 4 pour les faibles valeurs comprises entre 1,5 et 6 µg/ml, et un rapport de 5 pour des concentrations supérieures comprises entre 15 et 75 µg/ml.
Dans cette technique, le même montage ne permet donc pas d'associer un seuil et une amplitude de sensibilité suffisante.

PHENOMENES D'INTERFERENCES.

Les interférences des méthodes iodométriques sont nombreuses et les sources se rencontrent dans les milieux biologiques. De nombreux composés organiques, et plus spécialement les insaturés, consomment de l'iode.

Selon LINDSTROM et NORDSTRUM (18), les protéines et certains acides aminés interférent dans les déterminations : cystéine, méthionine, tryptophane, tyrosine, certains milieux de culture ... .

Selon J. LATRILLE (17) et F. CASTAGNOU (4), il apparaitrait de la pénicillamine au cours de la dégradation enzymatique des pénicillines, une mole de pénicillamine consommant 2 équivalents d'iode.

D'autre part, l'utilisation de pénicillinase nécessaire pour transformer la pénicilline en acide pénicilloïque représente un apport protéique consommateur d'iode supplémentaire.

En autoanalyse, un inconvénient majeur est la fixation d'iode par les tuyaux qui s'accompagne également de relargages d'iode incontrôlables, faussant complètement les dosages. Ce phénomène persiste, bien qu'atténué, dans les techniques utilisant la solution iode-amidon, comme le signalent LINDSTROM et NORDSTRUM (18).

Dans la technique que nous proposons, les seules interférences possibles résultent de la présence de composés susceptibles de donner la même réaction colorée. Or, comme nous l'avons déjà signalé, la technique est appliquée à des solutions pures de β lactamines :

préparations pharmaceutiques, solutions pures en vue des études d'activités β lactamasiques.

De plus, contrairement à ce qui a été annoncé par certains auteurs, la méthode est applicable à la détermination de pénicilline en solution dans les milieux bactériologiques usuels.

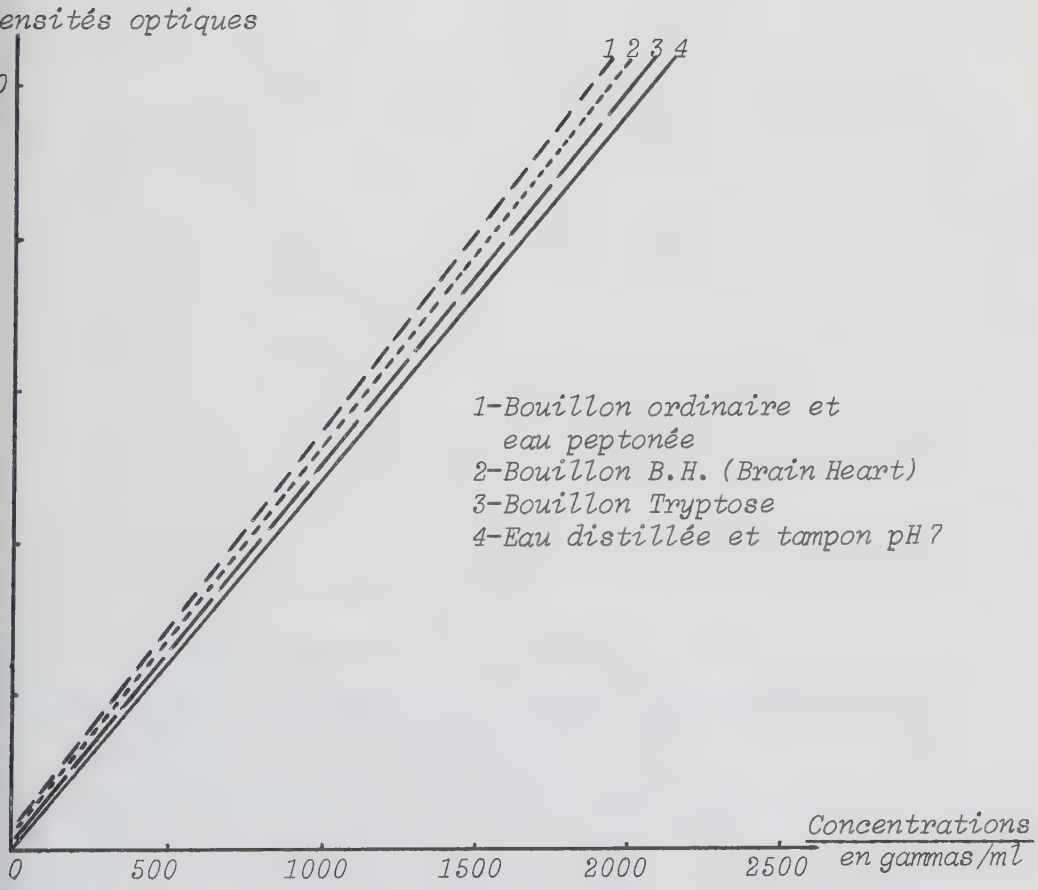
La figure n° 7 représente les courbes d'étalonnage de benzylpénicilline réalisées dans différents milieux. Les différences observées sont dues à des conditions de pesée, donc inhérentes à la préparation des différentes solutions. Un seul milieu est inutilisable : le milieu de DUBOS qui contient du Tween 80, dont la structure ester est responsable des interférences.

Si la méthode est applicable directement aux milieux complexes artificiels, elle ne l'est pas pour les milieux naturels, tel l'urine. Ainsi, par suite de la présence de chromogènes, la détermination de l'élimination de β lactamines par voie urinaire est impossible. Elle peut être par contre réalisée après élimination des chromogènes : esters d'origine lipidique, glycuronoconjugués... par chromatographie sur couche mince. Après élution, la fraction β lactamine est récupérée. La solubilisation est effectuée en tampon pH 7 barbital-acétate ou dans l'eau distillée . Le gel insoluble est éliminé par centrifugation. Le rendement d'extraction est compris entre 85 et 90 %.

Figure n° 1

COURBES D'ETALONNAGES

UTIONS DE BENZYL PENICILLINE DANS DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE



COMPARAISON AVEC LA TECHNIQUE DE FORD

La technique proposée ne présente pas les inconvénients réels de la méthode de FORD (9), qui ont été récemment résumés par M. H. RICHMOND et R. B. SYKES (26).

- Instabilité du complexe coloré formé, complexe sensible aux variations du potentiel d'oxydoréduction, rendant la technique peu reproductible.
- Méthode inapplicable aux études d'activités enzymatiques, en raison de son manque de sensibilité.

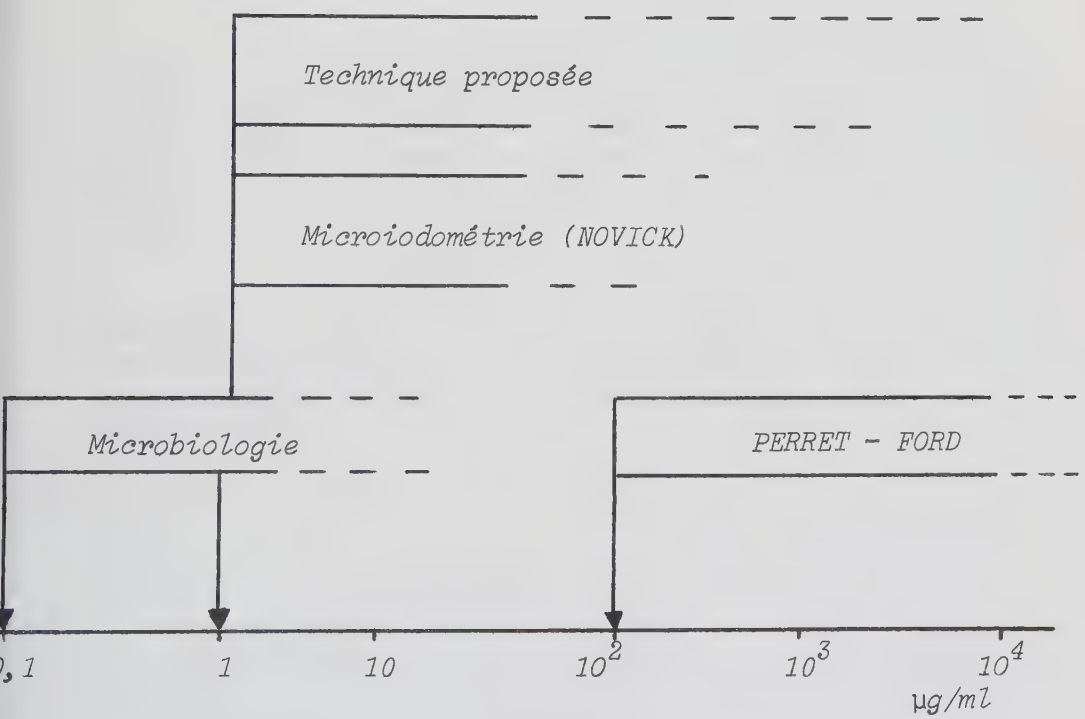
  Les améliorations apportées, à la suite de l'automatisation de cette réaction, éliminent les imperfections de la technique de FORD (9).
- Mélange réactionnel parfaitement limpide après suppression de l'alcool à 95c dans la composition du réactif A utilisé par SNELL.
- Lecture effectuée après un délai constant de 3 mn.
- Maximum de sensibilité obtenu pour une concentration accrue en alun ferrique, conjointement à une modification des volumes réactionnels.
- Amplification du système de détection.

L'ensemble de ces modifications permet la détection d'une concentration égale à 1 µg/ml alors que la méthode de FORD n'est sensible qu'à 100 µg/ml en benzylpénicilline.

Cette sensibilisation est comparable à celle apportée par les méthodes microiodométriques à la technique iodométrique de PERRET dont le seuil de sensibilité est également de 100 µg/ml de benzylpénicilline.

Nous pouvons donc compléter le tableau proposé par HAMILTON MILLER (12).

Tableau n° 5



-:-

APPLICATION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE CHIMIQUE DES β LACTAMINES

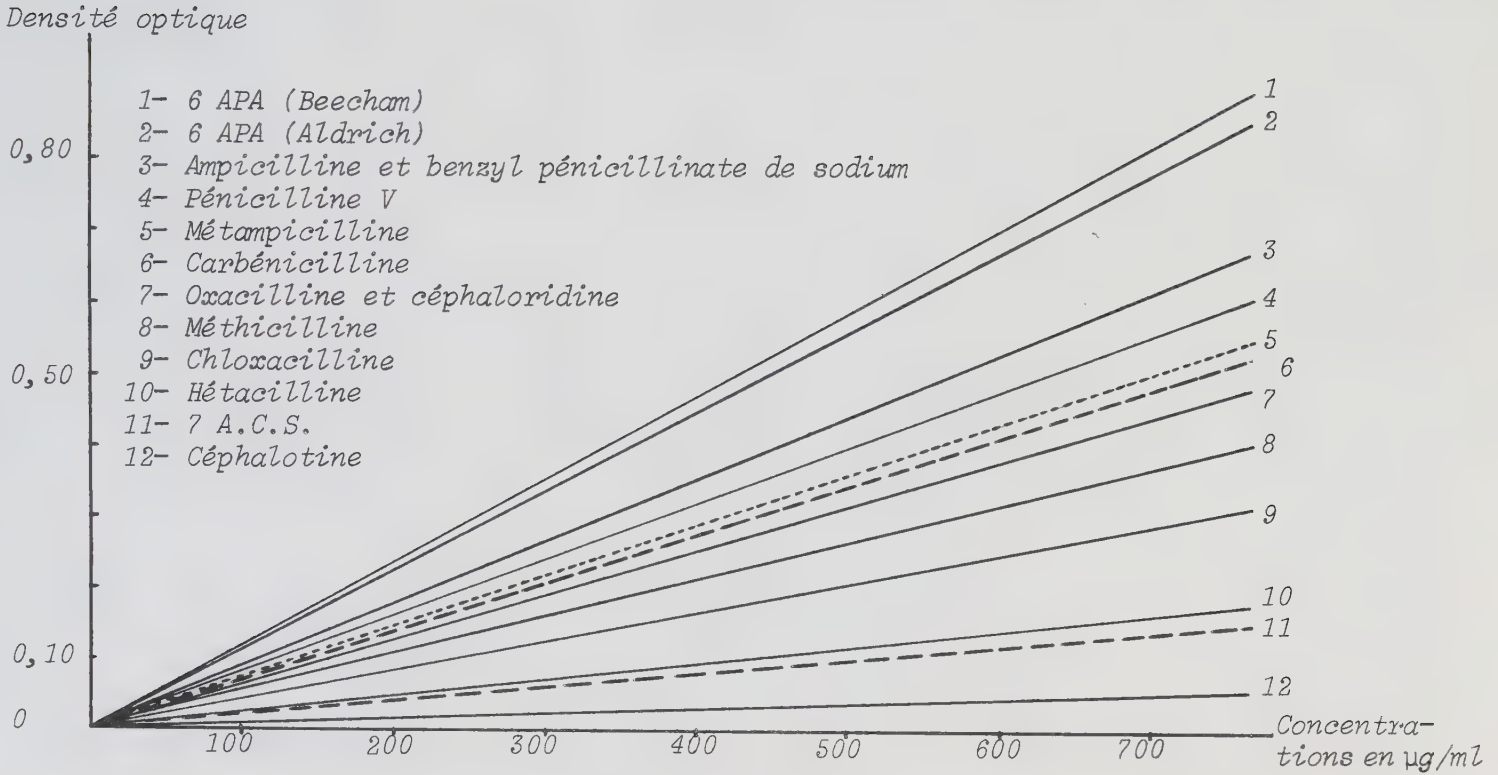
Pour des concentrations identiques, l'intensité d'absorption pour chaque β lactamine n'est pas forcément proportionnelle au rapport des poids moléculaires. La figure n° 8 représente les courbes d'étalonnage des différentes β lactamines testées pour des concentrations comprises entre 0 et 750 µg/ml.

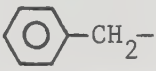
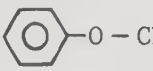
La nature des chaînes latérales influe sur la coloration du complexe. En effet, les pénicillines à chaînes latérales structuralement voisines comme la *banzylpénicilline* et la *pénicilline V* donnent des rapports d'absorption proportionnels aux rapports des poids moléculaires.

Figure n° 8

COURBES D'ETALONNAGES DES PRINCIPALES β LACTAMINES

entre 0 et 750 µg / ml

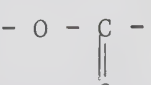


	Benzylpénicilline	*Pénicilline V*
Chaîne latérale		
Poids moléculaire	356	389
Intensité d'absorption (D.O) pour 750 µg/ml.	0,67	0,60

Le rapport des poids moléculaires est de $\frac{356}{389} = 0,91$. Celui des intensités d'absorption est de $\frac{0,60}{0,67} = 0,89$.

Les résultats sont totalement différents si nous considérons le cas de la *Céphaloridine* et de la *Céphalotine* qui présentent des poids moléculaires pratiquement identiques, mais des chaînes latérales différentes.

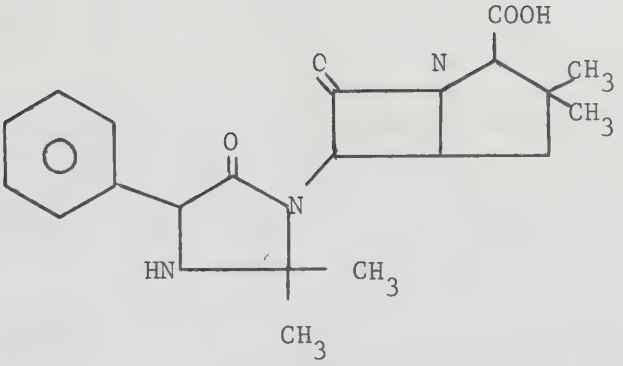
L'intensité d'absorption dans ce cas est très différente pour les deux molécules.

	Céphaloridine	*Céphalotine*
Chaîne latérale		
Poids moléculaire	415	418
Intensité d'absorption en D.O. pour 750µg/ml	0,58	0,05

Le rapport des poids moléculaires est de $\frac{415}{418} = 0,99$ alors que celui des intensités d'absorption est de $\frac{0,05}{0,58} = \boxed{0,086}$

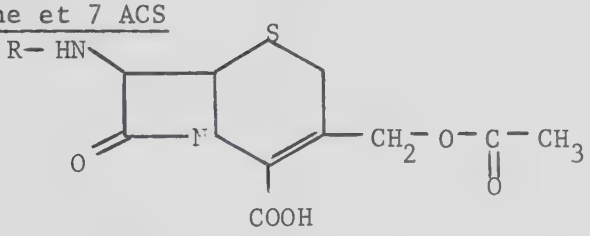
Dans la plupart des cas, l'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en "*fonction* β lactame intracyclique".

Mais pour certaines molécules : Hétacilline, 7 A.C.S., Céphalotine, les colorations données sont très inférieures à celles que l'on pourrait espérer. La cause de cette diminution de sensibilité semble dépendre des structures chimiques. Les composés envisagés présentent soit deux fonctions Lactames, soit une fonction Lactame et une fonction ester (acyloxyméthyl) qui réagit avec l'hydroxylamine de façon identique à la fonction β lactame.

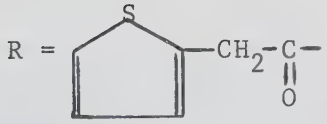


2 fonctions "lactamases" intracycliques

Céphalotine et 7 ACS



R = H : 7 ACS

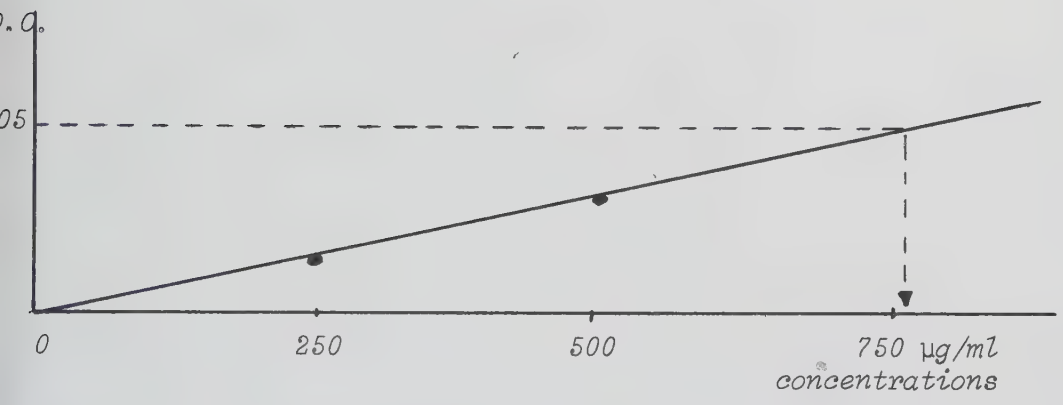


Céphalotine

Pour tenter d'expliquer ces phénomènes, nous avons effectué les investigations suivantes afin de détruire par hydrolyse alcaline l'une des deux fonctions réactives. Les résultats obtenus traduisent la mise en valeur d'une seule fonction réactive. L'intensité d'absorption est alors très sensiblement augmentée.

Les études suivantes ont été réalisées sur la *céphalotine*.

Courbe d'étalonnage de la céphalotine.

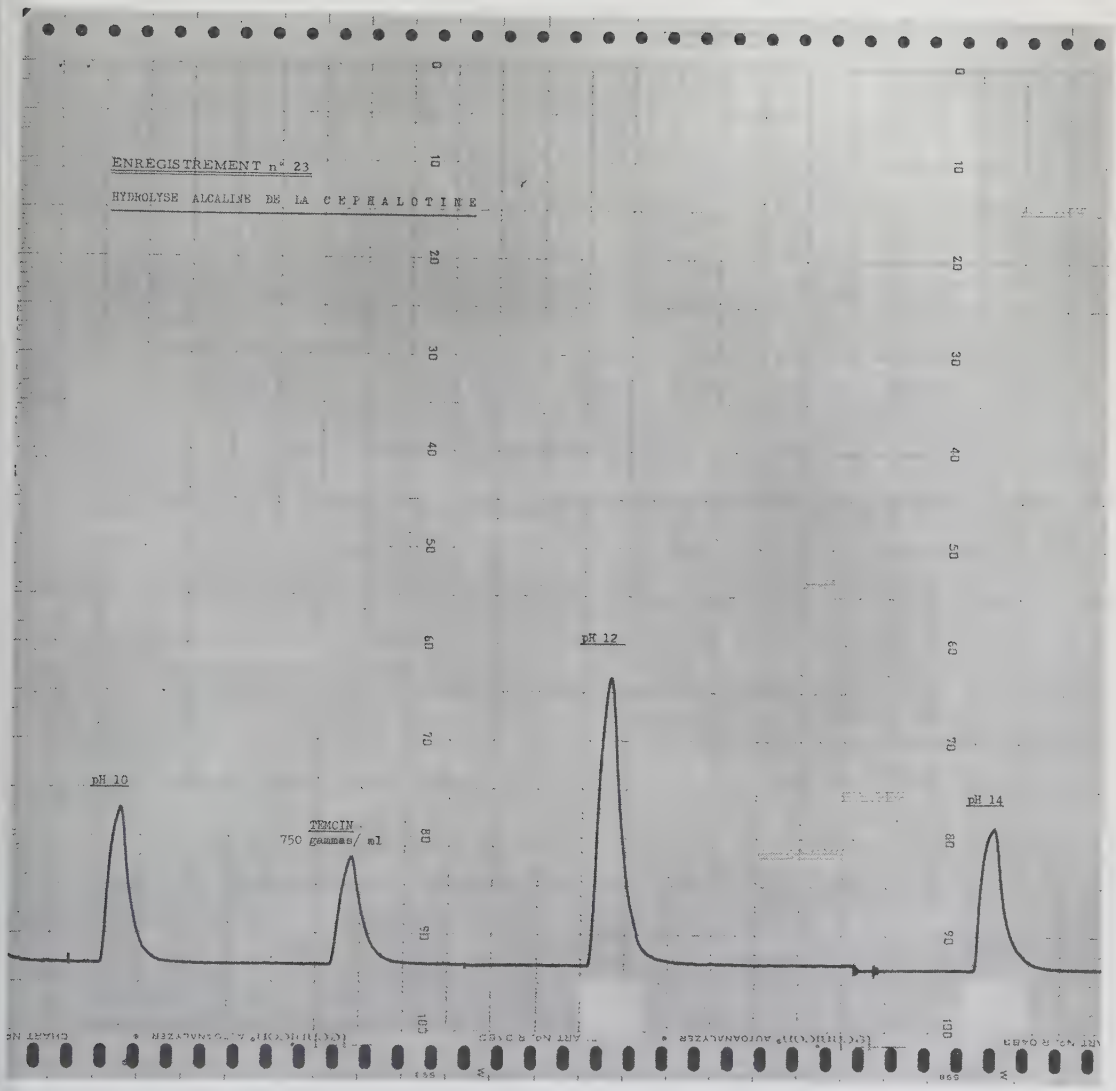


La courbe d'étalonnage pour les concentrations 250, 500 et 750 µg/ml est reproduite en échelle arithmétique.

Hydrolyse alcaline.

150 mg de céphalotine sont dissous dans 100 ml de tampon pH 7. Le pH est ajusté à la valeur désirée : 10 - 12 - 14 par addition de soude N. Cette solution alcalinisée est portée au bain-marie à 100° pendant 3 mn.

Après refroidissement, la solution est neutralisée par addition d'un volume d'acide chlorhydrique N égal au volume de soude précédemment introduit pour l'hydrolyse. Le volume final est complété à 200 ml par addition de tampon pH 7. La solution finale "correspond" à 750 µg/ml de céphalotine non hydrolysée introduite avant traitement alcalin. Elle sert à déterminer l'intensité d'absorption par formation d'hydroxamates ferriques à l'aide de la technique proposée.


ENREGISTREMENT n° 23
HYDROLYSE ALCALINE DE LA CEPHALOTINE
pH 10
TEMOIN
750 gammes/ ml
pH 12
pH 14

Les résultats sont les suivants (enregistrement n° 23) :

Solutions	*Densité optique*
Solution témoin 750 µg/ml	0,050
Hydrolysat pH 10	0,075
- pH 12	0,155
- pH 14	0,070

Le maximum d'absorption est obtenu pour pH 12. Au maximum d'alcalinité (pH 14), l'intensité est inférieure. L'effet de mise en valeur d'une fonction réactive est très certainement doublé de son hydrolyse partielle impliquant une diminution de la concentration en "β lactame" ou "fonction ester" libre.

Ce phénomène est également reproduit par hydrolyse enzymatique à condition de choisir une β lactamase active sur la céphalotine.

Nous avons observé lors de la pratique des "profils" d'activité β lactamasique faisant intervenir des germes entiers (voir conditions opératoires 2ème partie § E) que les "pics" correspondants au substrat céphalotine présentent une intensité d'absorption nettement supérieure à celle de la concentration initialement engagée.

Or, classiquement, une hydrolyse enzymatique se traduit par une diminution de concentration du substrat engagé, non par une augmentation.

L'augmentation d'intensité d'absorption des pics céphalotine peut traduire la "sensibilité" de ce substrat à certaines β lactamases. Dans ces conditions, la fonction touchée serait le cycle β *lactame* et la fonction réactive, mise en valeur, serait obligatoirement la fonction ester latérale *acyloxy méthyl*.

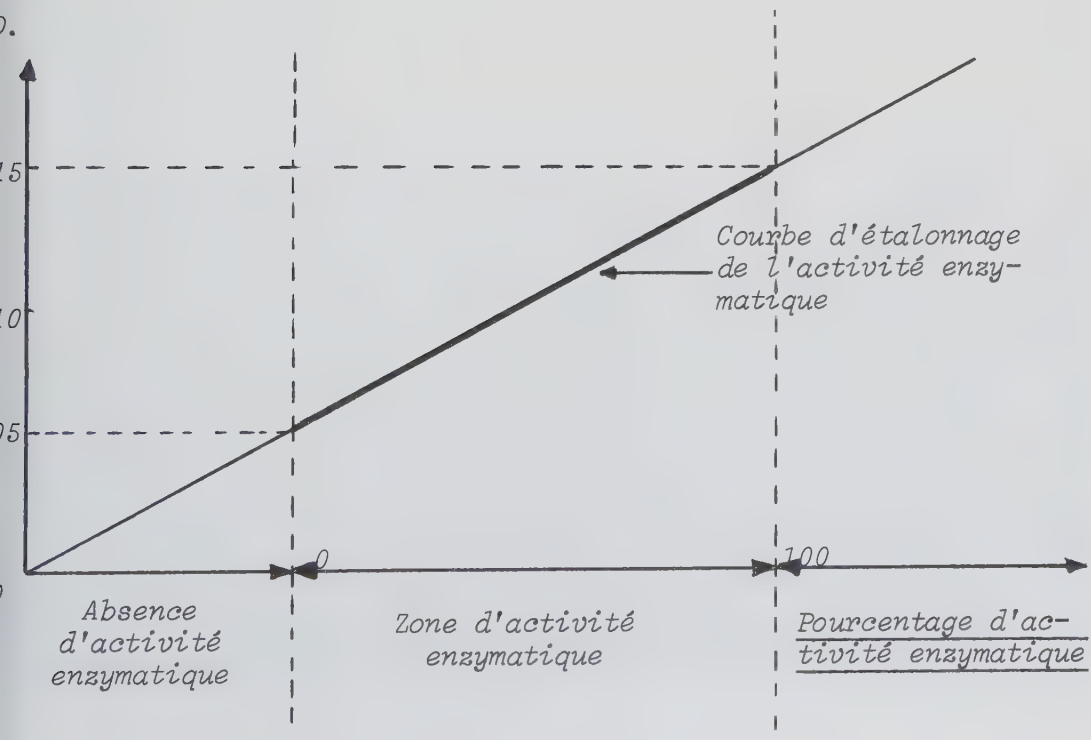
Cette hypothèse peut être énoncée en raison de la spécificité d'action des β lactamases sur les β lactames.

Afin d'apprécier cette activité enzymatique, il conviendrait de réaliser une courbe d'étalonnage à partir de céphalotine hydrolysée à pH 12.

Lors d'une dégradation enzymatique, un pic présentant l'intensité maximale d'absorption : 0,155 correspondrait à une hydrolyse totale des 750 µg/ml de céphalotine.

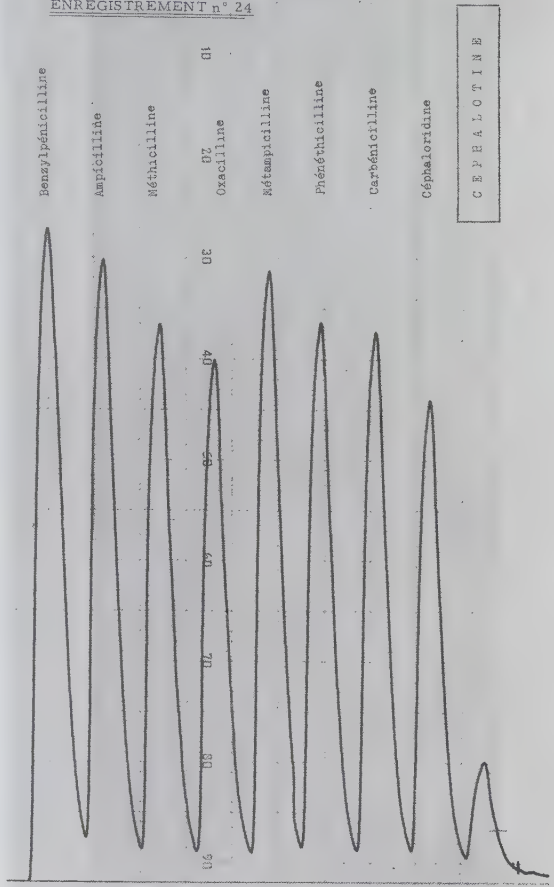
La limite inférieure représentée par un pic correspondant à une intensité de 0,05 impliquerait une absence totale d'activité enzymatique.

On peut représenter graphiquement ces phénomènes de la façon suivante :



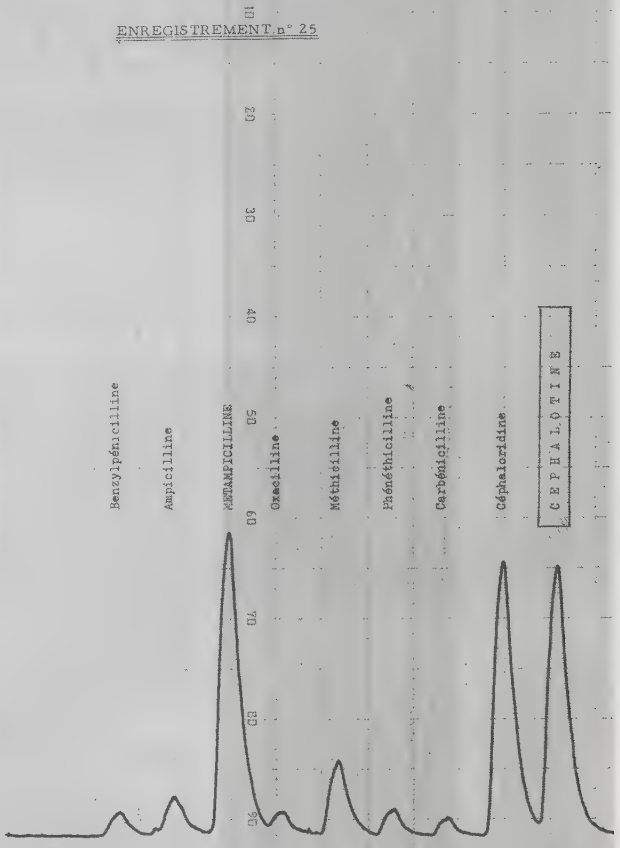
Profil n° 1 : PSEUDOMONAS AERUGINOSA

ENREGISTREMENT n° 24



PROFIL n° 2 : SERRATIA 329 hébergeant le facteur de polyrésistance transféré du PROTEUS 48

ENREGISTREMENT n° 25



Exemples de profils enregistrés.

Profil n° 1 (Pseudomonas aeruginosa LAV.) :

Le germe testé est sensible aux différents substrats : absence d'activité enzymatique. *Le pic Céphalotine* correspond à 0,05 de densité optique (Enregistrement n° 24).

Profil n° 2 (Serratia 329 hébergeant le facteur de polyrésistance transféré du Proteus 48) :

Souche résistante à la plupart des substrats.

Le pic Céphalotine correspond à 0,15 de densité optique (Enregistrement n° 25).

Tentative d'explication du phénomène.

Ces observations relatives à la céphalotine n'ont pas été reproduites avec l'Hétacilline pour laquelle les dégradations enzymatiques se traduisent par une diminution de l'intensité d'absorption comparativement à une valeur témoin.

La présence de deux fonctions réactives stériquement voisines diminue la probabilité de formation des complexes hexacoordinés par encombrement stérique. Cet antagonisme diminue statistiquement la formation totale du complexe. Par contre, la suppression d'une de ces deux fonctions permet à la fonction résiduelle de s'exprimer normalement.

La concentration du réactif A en hydroxylamine est limitée par l'effet réducteur de ce composé sur le fer ferrique lorsque la concentration en hydroxylamine est augmentée.

Il semble difficile de résoudre ce problème : l'augmentation de la concentration en hydroxylamine très probablement favorable pour ces molécules à deux fonctions réactives, entraîne une perte de sensibilité par réduction des complexes ferriques.

D E U X I E M E P A R T I E

APPLICATIONS DE LA TECHNIQUE A L'ETUDE DES β LACTAMASES

CONDITIONS GENERALES D'APPLICATION A L'ETUDE DES β LACTAMASES

Le technique proposée permettant de déterminer les β lactamines et non les dérivés d'acides pénicilloïques, peut être directement appliquée à l'étude de l'activité β lactamasique.

Dans les chapitres précédents nous avons exposé le dosage chimique des β lactamines, les solutions à doser étant réalisées dans l'eau distillée.

En vue d'une étude d'activité enzymatique, une modification importante doit être apportée. Pour éviter les variations du pH, qui doit être maintenu constant, les solutions de substrats et les solutions enzymatiques seront tamponnées.

Le choix du tampon pour les différentes solutions, a été guidé par un certain nombre de faits.

Valeur du pH du tampon.

Différents auteurs ayant étudié l'activité pénicillinasique des bactéries à Gram +, ont démontré que le pH permettant une activité enzymatique maximale était de l'ordre de 5,9 - 6 : cas d'exopénicillinases élaborées par les Bacillus et les Staphylocoques notamment.

Contrairement à ces auteurs, nos études ont porté essentiellement sur les β lactamases de germes à Gram -, plus particulièrement les Entérobactéries. Nous avons travaillé à pH 7.

NATURE DU TAMPON.

Le tampon pH 7 classiquement utilisé pour l'étude des β lactamases est le tampon phosphate 0,066 M molaire de SÖRENSEN. FORD dans sa technique utilise un tampon phosphate 0,0025 M.

Mais il a été démontré par BOXER et EVERETT que les ions phosphate réduisent l'intensité de coloration des hydroxamates ferriques.

LIPMANN et TUTTLE (19) constatent également que l'intensité colorée des hydroxamates ferriques est diminuée par certains anions tels que les florures et les phosphates, et de façon moins importante par les oxalates et les sulfates.

FORD, pour sa part, a étudié l'influence des phosphates sur la coloration du complexe. Il rapporte les résultats suivants :

Concentration en Phosphate en moles p. 1000	*Activité relative de la coloration*
0,0	100
0,0025	99
0,25	58

Il conclut que l'emploi d'un tampon 2,5 millimolaire entraîne une diminution d'intensité colorée de l'ordre de 1 pour cent.

D'autre part, nous avons observé en autoanalyse la formation de précipités blancs apparaissant dès le contact des solutions à doser et du réactif A, provoquant une obstruction des différents tuyaux rendant impossible toute manipulation.

Pour ces raisons : perte de sensibilité et apparition de précipités, nous avons définitivement rejeté l'emploi des tampons phosphates.

Différents tampons pH 7 pouvaient être utilisés à conditions que les constituants n'interfèrent pas avec le substrat. Ainsi le tampon tris-Maléate d'après GOMORI est à rejeter en raison de la présence d'anhydride maléique (cf. 1ère partie, chapitre II).

Notre choix s'est porté sur un tampon Barbital-Acétate dont l'emploi était déjà préconisé par BOXER et EVERETT.

Tampon Barbital sodique - acétate pH 7 selon MICHAELIS : 0,28 M.

Solution n° 1 :

CH_3COONa, 3 H_2O	19,43	g
Barbital sodique	29,43	g
Eau distillée q.s.p.	1000	ml

Solution n° 2 :

HCL 0,1 N.

Solution n° 3 :

Solution aqueuse de NaCl à 85 g pour 1000.

Le tampon est obtenu par mélange de :

solution n° 1 ..... 200 ml
solution n° 2 ..... 242 ml
solution n° 3 ..... 160 ml
eau distillée q.s.p. 1000 ml

Dans ces conditions expérimentales, le bac de rinçage du SAMPLER II est alimenté par du tampon Barbital-Acétate au lieu d'être alimenté par de l'eau distillée. Les solutions enzymatiques et les solutions des différents substrats sont réalisées dans ce tampon.

APPLICATION A LA DETERMINATION DES CONSTANTES CINETIQUES

CINETIQUES ENZYMATIQUES - DEFINITIONS.

En fonction de leurs propriétés, les enzymes peuvent être définies comme des catalyseurs ou biocatalyseurs qui permettent d'accélérer des réactions biochimiques vers leur position d'équilibre. Sans leur intervention, ces réactions ne se dérouleraient que très lentement ou dans des conditions incompatibles avec la vie : température, concentrations relatives des réactifs. L'accélération correspond à une *diminution de la barrière d'Energie* existant entre le produit de départ et le produit terminal.

Les enzymes manifestent une *spécificité d'action* qui revêt deux aspects :

- spécificité de fonction
- spécificité de substrat

L'enzyme E agit sur une substance qui, si elle est spécifique pour cette enzyme, sera activiée. Les molécules passent d'un état inactif à un état *réactif*. La substance S est alors appelée *Substrat*. La spécificité de l'enzyme pour ce substrat est due à la présence de *récepteurs* ou centres actifs.

Les enzymes appartiennent à la classe des *macromolécules* de structure protéique. Ce sont, soit des holoprotéines, soit des hétéroprotéines : protéines associées à un coenzyme.

Par suite de leur nature protéique, ces macromolécules,

- sont d'une grande *fragilité :* leur dénaturation par les agents physicochimiques est due à la rupture des structures tertiaires et quaternaires
- ont une *activité réglable*, soit par inhibition, soit par activation.

Vitesse de réaction enzymatique.

Accélérer la vitesse des réactions spontanées pour libérer l'énergie emmagasinée est une fonction vitale des enzymes.

On appelle *vitesse V* d'une réaction enzymatique, la quantité de substrat disparu ou de métabolite apparu par unité de temps.

La vitesse s'exprime en moles / litre / minute ou seconde.

La vitesse des réactions enzymatiques peut être affectée par différents facteurs :

1. Effet de la concentration des réactifs.

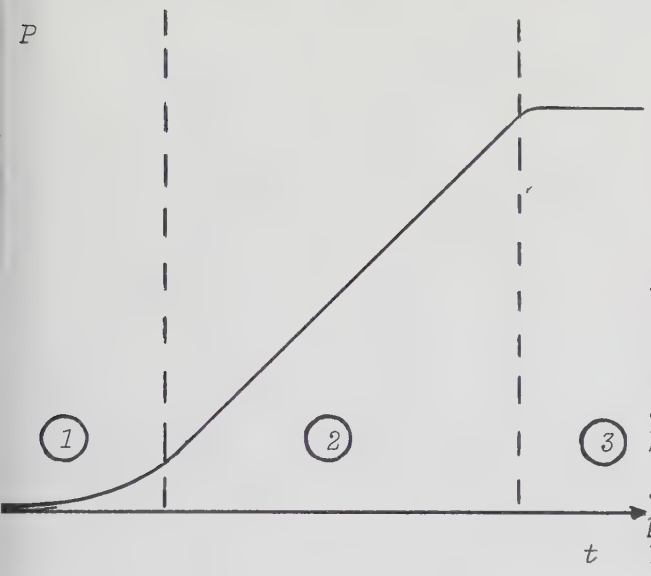
La vitesse de réaction est proportionnelle aux concentrations de molécules engagées dans la réaction.

... concentration en enzyme : la vitesse d'une réaction enzymatique est directement proportionnelle à la concentration de l'enzyme, qui par contre n'affecte pas la constante K d'équilibre de la réaction :

$$E + S \rightleftarrows E S \rightleftarrows E + P$$

qui est la même que l'équilibre soit atteint spontanément ou par catalyse enzymatique.

Si l'on fait varier P en fonction du temps, on définit 3 zones successives :



1. Etat préstationnaire

$E + S \rightleftarrows E\,S \rightarrow E + P$

2. Etat stationnaire

$$\frac{d\,ES}{dt} = 0$$

Au cours de l'état stationnaire la formation et la déformation de ES sont équivalentes. L'état *stationnaire est invariable dans le temps.*

3. La courbe atteint un plateau qui correspond à l'épuisement du substrat.

Figure n° 9

... concentration en substrat.

Si on augmente la concentration en substrat tout en maintenant constants les autres paramètres, la vitesse initiale tend vers une *valeur maximale Vm* et ne dépasse pas cette valeur si la concentration continue d'augmenter.

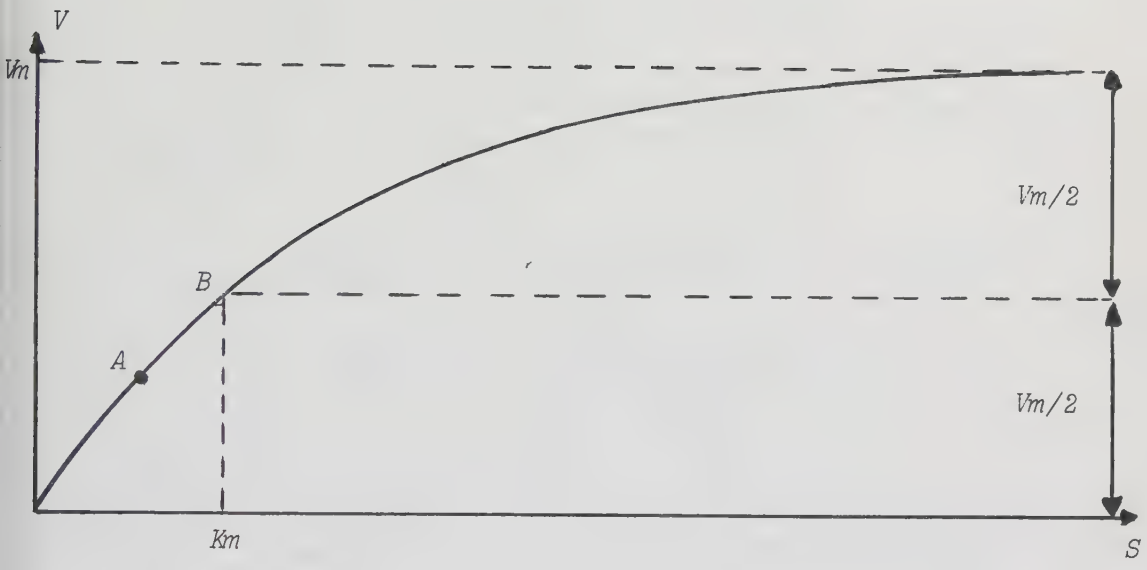


Figure n° 10

Même pour de très faibles concentrations, le nombre de molécules du substrat excède de beaucoup celui des molécules d'enzyme.

Lorsque la Vm est atteinte, cela signifie que toutes les molécules d'enzyme sont combinées aux molécules de substrat S. *Il n'y a plus d'enzyme libre*. C'est ce qui se passe au point C sur le schéma précédent.

Au point B la moitié des molécules d'enzyme sont combinées ou saturées par le substrat. *La vitesse est donc égale à la moitié de la vitesse maximale*.

La concentration de substrat, correspondante à cette Vm/2 est *appelée Km*.

C'est la constante de *MICHAELIS*.

Le Km se mesure expérimentalement en construisant la courbe de variation de V en fonction de la concentration en substrat. Equivalent à une concentration le Km s'exprime en "moles/litre" ou en toute autre unité arbitrairement choisie pour exprimer la concentration du substrat.

Equation de Michaelis : $V = \frac{Vm\ [S]}{Km + [S]}$

... si la concentration est trop faible pour produire Vm/2, la vitesse V est fonction de [S]
V = F [S]

... si la concentration [S] est très supérieure au Km, la vitesse V = Vm

... quand [S] = Km, la vitesse V = Vm/2

Calcul du Km.

Les courbes de saturation, précédemment définies, permettent difficilement d'évaluer la Vm et le Km. Pour les déterminer, on fait appel à l'équation de LINEWEAVER-BURKE, qui est l'équation d'une droite

y = ax + b dans laquelle y représente 1 / V
x représente 1 / S

Il en résulte que b représente 1/Vm, la pente "a" correspond au rapport Km/Vm. Il suffit donc de construire la courbe de variation de 1/V en fonction de 1/S.

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{Vm.\ S} + \frac{1}{Vm} = \frac{1}{Vm}\left(\frac{Km}{S} + 1\right)$$

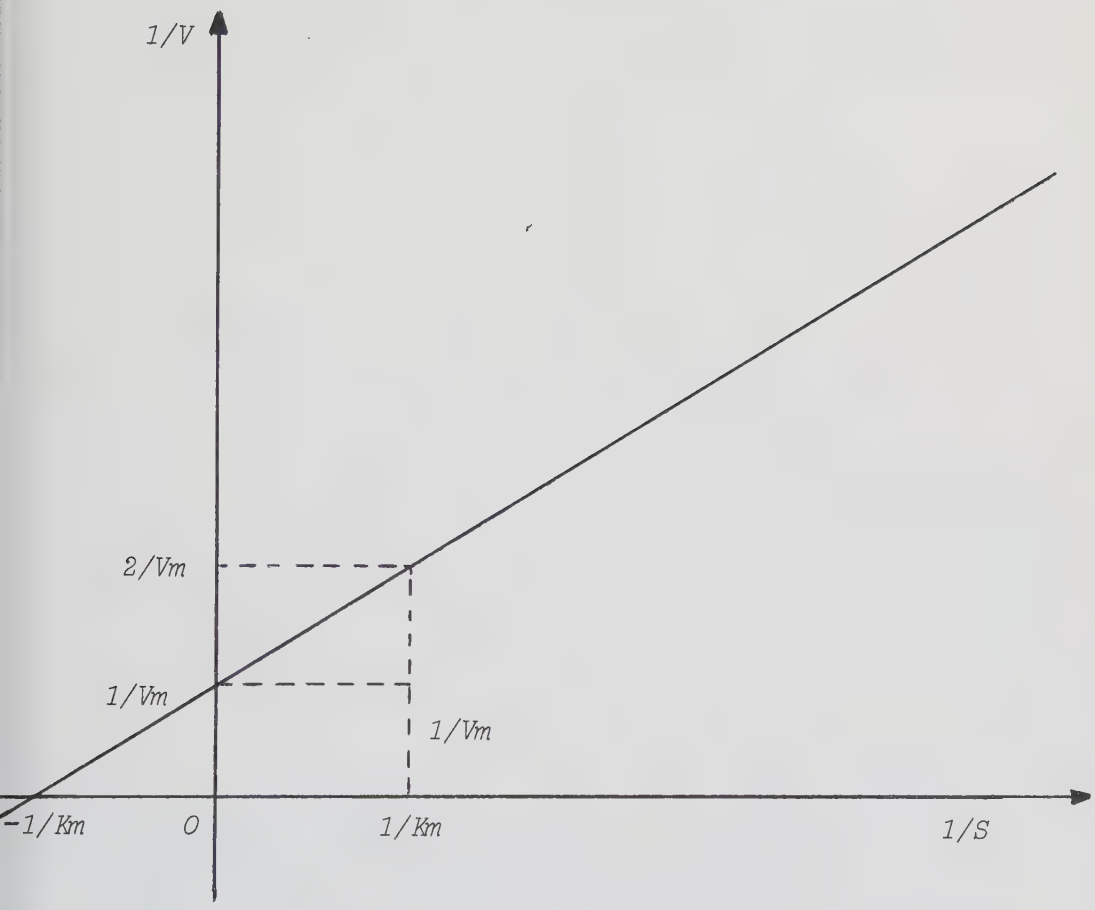


Figure n° 11

2. Influence du facteur température.

Entre certaines valeurs limites, l'intensité d'une réaction enzymatique augmente avec la température.

Le rapport exact exprimant les changements de vitesse entraînées par une élévation de température égale à 10° C est appelé Q_{10} ou *coefficient de température.*

Quand on mesure la vitesse des réactions enzymatiques à plusieurs températures, on obtient une courbe typique de Gauss. Il existe donc une température optimum pour laquelle la réaction est la plus forte. Au dessus, la vitesse de la réaction diminue brusquement.

Activité enzymatique.

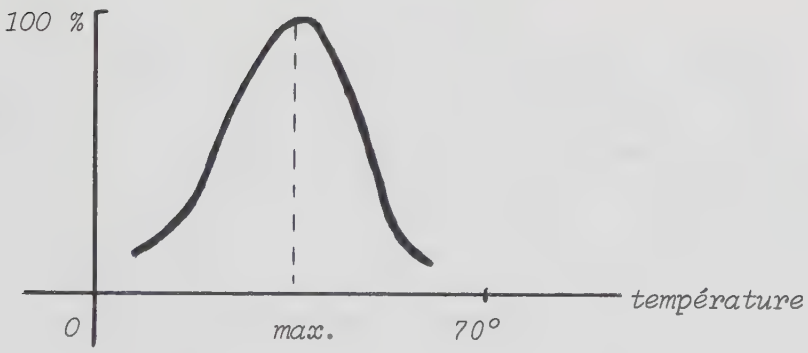


Figure n° 12

L'augmentation de la vitesse d'une réaction enzymatique avec la température s'explique par l'accroissement de l'énergie cinétique des molécules en réaction. Cependant si la température dépasse le point optimum, l'énergie cinétique des molécules enzymatiques devient trop élevée et excède la barrière énergétique. Il y a alors destruction des liaisons secondaires qui procurent l'activité catalytique. La perte des structures II et III empêche l'enzyme d'exercer son activité biologique.

3. Influence du facteur pH.

De légères variations du pH affectent l'état ionique de l'enzyme et souvent aussi celui du substrat. Quand on mesure l'activité enzymatique en fonction du pH, on constate généralement qu'elle présente un maximum pour des pH compris entre 5 et 9.

Selon Victor RODWELL (27), trois facteurs déterminent l'allure des courbes obtenues en faisant varier l'activité enzymatique en fonction du pH :

- dénaturation de l'enzyme à des pH très élevés ou très bas
- effet sur les charges de l'enzyme et du substrat. Quand une enzyme chargée négativement E^- réagit sur un substrat chargé positivement SH^+ :

$$E^- + SH^+ \rightarrow ESH$$

Si le pH est très faible $E^- + H^+ \rightarrow EH$ alors que si le pH est très élevé, SH^+ s'ionise en $S^- + H^+$.

Les valeurs extrêmes de pH entraînant la perte des formes E^- et SH^+, les seules à réagir normalement.

4. Influence d'autres facteurs.

L'oxydation conduit à des liaisons - S - S - à partir de fonctions -SH indispensables.

D'autre part les enzymes sont très sensibles aux radiations de courtes longueurs d'ondes : UV, β, γ, X.

-:-

EXEMPLE DE DETERMINATION DES CONSTANTES CINETIQUES POUR DIFFERENTS SUBSTRATS

ETUDE DE L'ENZYME NEUTRAPEN

Nous avons appliqué la technique de détermination du Km à l'étude d'une β lactamase purifiée : le NEUTRAPEN fourni par les Laboratoires CALBOCHIEN (Réf. n° 5163 - 31, lot n° 11.495), constitué par une exopénicillinase élaborée par Bacillus cereus.

TECHNIQUE OPERATOIRE.

Nous avons déterminé les constantes Vm et Km de cette enzyme pour les différents substrats suivants :

Benzylpénicilline	Phénéthicilline
Ampicilline	Carbénicilline
Métampicilline	Hétacilline
Pénicilline V	

Une concentration constante d'enzyme est mise en présence de concentrations variables de substrat. Elle varie en fonction de la sensibilité de ce dernier.

Le temps d'incubation a été choisi à 30 mn après avoir vérifié que, pour une concentration de substrat supérieure à 0,50 micromole/ml, la vitesse était constante pour un temps nettement supérieur au temps choisi, de l'ordre d'une heure.

V = f (t) = constante, pour une certaine concentration en substrat.

Donc le choix d'un temps d'incubation de 30 mn est compatible avec les données expérimentales précitées.

La température d'incubation ainsi que le pH ont été choisis, non pas arbitrairement, mais en fonction de la définition de l'unité enzymatique énoncée par le fournisseur : "une unité de Neutrapen est capable d'hydrolyser une unité de substrat par minute, à pH 7, à 25°".

Nous avons donc reproduit ces conditions.

Les concentrations de substrat utilisées sont les suivantes :

0,05 - 0,10 - 0,15 - 0,20 - 0,25 - 0,30 - 0,35 - 0,40 - 0,45 - 0,50 micromole de substrat par ml de solution.

Les solutions de substrat et d'enzyme sont réalisées en tampon pH 7 (barbital sodique - acétate). L'incubation est réalisée au bain-marie à 25°. Après incubation de 30 mn, on procède à un blocage de l'activité enzymatique par passage dans un bain de glace durant 30 mn. Les solutions à doser sont ensuite disposées en godets sur le Sampler de la chaîne Technicon, afin de déterminer les concentrations restantes de substrat, pour chaque concentration introduite au départ, comparativement aux témoins non traités par la solution enzymatique. *Le temps de latence* qui sépare la sortie des échantillons du bain de glace de leur prélèvement, en vue de la détermination des concentrations de substrat restant, n'a pas permis de déceler de variation de concentration.

Par différence entre les concentrations initiales et finale, on détermine la quantité de substrat dégradé pendant 30 mn d'incubation.

La vitesse de la réaction correspond à la quantité de substrat dégradé par minute.

On construit ensuite la courbe de variation de 1/V en fonction de 1/S.

Exemple : détermination des Vm et Km de la Pénicilline V.

La mise en contact des solutions de substrat et d'enzyme est réalisée de la façon suivante, pour chaque solution de substrat testée :

Tableau n° 6

	Témoin	*Dosage*
solution substrat	5 ml	5 ml
solution d'enzyme à 200 unités/ml	-	0,10 ml

ce qui correspond à 4 unités de Neutrapen par ml de solution substrat.

L'incubation est réalisée durant 30mn à 25°.

Les résultats sont exprimés dans le tableau n° 7.

Tableau n° 7

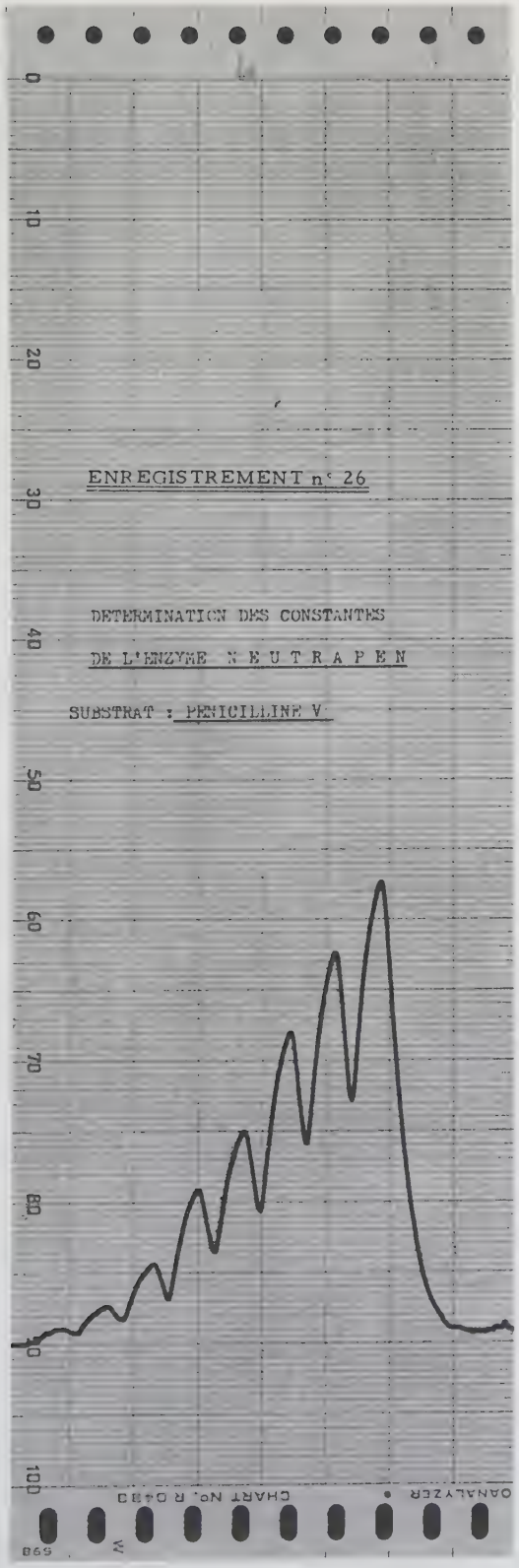
Substrat M/1000	*Concentrations restantes M/1000*	*Concentrations hydrolysées M/1000*	*V M/l/min⁻¹*	$\frac{1}{V}$	$\frac{1}{S}$
$10 \cdot 10^{-3}$	$0{,}010 \cdot 10^{-3}$	$0{,}090 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$0{,}33.10^{6}$	10^{4}
$15 \cdot 10^{-3}$	$0{,}030 \cdot 10^{-3}$	$0{,}120 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$0{,}25.10^{6}$	$6{,}6.10^{3}$
$20 \cdot 10^{-3}$	$0{,}060 \cdot 10^{-3}$	$0{,}140 \cdot 10^{-3}$	$4{,}66.10^{-6}$	$0{,}24.10^{6}$	5.10^{3}
$25 \cdot 10^{-3}$	$0{,}084 \cdot 10^{-3}$	$0{,}166 \cdot 10^{-3}$	$5{,}53.10^{-6}$	$0{,}19.10^{6}$	4.10^{3}
$30 \cdot 10^{-3}$	$0{,}130 \cdot 10^{-3}$	$0{,}170 \cdot 10^{-3}$	$5{,}66.10^{-6}$	$0{,}17.10^{6}$	$3{,}3.10^{3}$
$35 \cdot 10^{-3}$	$0{,}170 \cdot 10^{-3}$	$0{,}180 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-6}$	$0{,}16.10^{6}$	$2{,}8.10^{3}$
$40 \cdot 10^{-3}$	$0{,}206 \cdot 10^{-3}$	$0{,}194 \cdot 10^{-3}$	$6{,}46.10^{-6}$	$0{,}15.10^{6}$	$2{,}5.10^{3}$

L'enregistrement n° 26 représente l'enregistrement des concentrations restantes.

Les valeurs de Km et Vm sont déterminées par constructions de la courbe de Lineweaver - Burke : variation de 1/V en fonction de 1/S.

$1/Vm = 0{,}10 \cdot 10^{6} \rightarrow Vm = 10^{-5}$ M/1/min^{-1}

$1/Km = 4{,}4 \cdot 10^{3} \rightarrow Km = 0{,}227 \cdot 10^{-3}$ M/1


ENREGISTREMENT n° 26
DETERMINATION DES CONSTANTES
DE L'ENZYME N E U T R A P E N
SUBSTRAT : PENICILLINE V
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
CHART No. R 0430
ANALYZER

RESULTATS OBTENUS POUR L'ENSEMBLE DES SUBSTRATS TESTES (voir tableaux n° 8 - 9 - 10 et figure n° 13 - 14).

Les valeurs mesurées de Vm et Km pour les différents substrats testés sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau n° 8

Constantes / Substrats	*Vm moles/litre/min*$^{-1}$	*Km moles/litre*
Benzylpénicilline	$8,3 \cdot 10^{-6}$	$0,277 \cdot 10^{-3}$
Ampicilline	$13,3 \cdot 10^{-6}$	$0,370 \cdot 10^{-3}$
Métampicilline	$25 \cdot 10^{-6}$	$1,25 \cdot 10^{-3}$
Pénicilline V	$1 \cdot 10^{-5}$	$0,227 \cdot 10^{-3}$
Phénéthicilline	$4,34 \cdot 10^{-6}$	$0,147 \cdot 10^{-3}$
Carbénicilline	$7,7 \cdot 10^{-6}$	$0,457 \cdot 10^{-3}$
Hétacilline	$25 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-3}$

DETERMINATION DES CONSTANTES CINETIQUES DU N E U T R A P E N

BENZYLPENICILLINE - AMPICILLINE - HETACILLINE

SUBSTRAT en oles/1000	Concentrations restantes Moles/1000	Concentrations hydrolysées Moles/1000	VITESSE Moles/ 1/min^{-1}	1 / V	1 / S
			BENZYLPENICILLINE		
,5 .10^{-3}	0,006.10^{-3}	0,044.10^{-3}	1,46.10^{-6}	0,685.10^{6}	20 .10^{3}
,10 .10^{-3}	0,032.10^{-3}	0,068.10^{-3}	2,26.10^{-6}	0,442.10^{6}	1 .10^{4}
,15 .10^{-3}	0,050.10^{-3}	0,100.10^{-3}	3,33.10^{-6}	0,300.10^{6}	6,6 .10^{3}
,20 .10^{-3}	0,094.10^{-3}	0,106.10^{-3}	3,53.10^{-6}	0,283.10^{6}	5 .10^{3}
,25 .10^{-3}	0,130.10^{-3}	0,120.10^{-3}	4 .10^{-6}	0,250.10^{6}	4 .10^{3}
,30 .10^{-3}	0,170.10^{-3}	0,130.10^{-3}	4,33.10^{-6}	0,230.10^{6}	3,3 .10^{3}
,35 .10^{-3}	0,216.10^{-3}	0,134.10^{-3}	4,46.10^{-6}	0,224.10^{6}	2,8 .10^{3}
,40 .10^{-3}	0,270.10^{-3}	0,130.10^{-3}	4,33.10^{-6}	0,230.10^{6}	2,5 .10^{3}
45 .10^{-3}	0,320.10^{-3}	0,130.10^{-3}	4,33.10^{-6}	0,230.10^{6}	2,2 .10^{3}
50 .10^{-3}	0,340.10^{-3}	0,160.10^{-3}	5,33.10^{-6}	0,187.10^{6}	2 .10^{3}
			AMPICILLINE		
05 .10^{-3}	0,015.10^{-3}	0,035.10^{-3}	1,16.10^{-6}	0,862.10^{6}	20 .10^{3}
10 .10^{-3}	0,020.10^{-3}	0,080.10^{-3}	2,66.10^{-6}	0,376.10^{6}	1 .10^{4}
15 .10^{-3}	0,044.10^{-3}	0,106.10^{-3}	3,53.10^{-6}	0,283.10^{6}	6,6 .10^{3}
20 .10^{-3}	0,075.10^{-3}	0,125.10^{-3}	4,16.10^{-6}	0,240.10^{6}	5 .10^{3}
25 .10^{-3}	0,096.10^{-3}	0,154.10^{-3}	5,13.10^{-6}	0,194.10^{6}	4 .10^{3}
30 .10^{-3}	0,124.10^{-3}	0,176.10^{-3}	5,86.10^{-6}	0,170.10^{6}	3,3 .10^{3}
35 .10^{-3}	0,168.10^{-3}	0,184.10^{-3}	6,13.10^{-6}	0,163.10^{6}	2,8 .10^{3}
			HETACILLINE		
5 .10^{-3}	0,015.10^{-3}	0,035.10^{-3}	1,16.10^{-6}	0,862.10^{6}	20 .10^{3}
10 .10^{-3}	0,026.10^{-3}	0,074.10^{-3}	2,46.10^{-6}	0,406.10^{6}	10 .10^{4}
15 .10^{-3}	0,044.10^{-3}	0,106.10^{-3}	3,53.10^{-6}	0,267.10^{6}	6,6 .10^{3}
20 .10^{-3}	0,066.10^{-3}	0,134.10^{-3}	4,46.10^{-6}	0,224.10^{6}	5 .10^{3}
25 .10^{-3}	0,090.10^{-3}	0,160.10^{-3}	5,33.10^{-6}	0,187.10^{6}	4 .10^{3}
30 .10^{-3}	0,158.10^{-3}	0,192.10^{-3}	6,40.10^{-6}	0,156.10^{6}	2,8 .10^{3}

Tableau n° 9

DETERMINATION DES CONSTANTES CINETIQUES DU N E U T R A P E N

METAMPICILLINE - PHENETHICILLINE - CARBENICILLINE

SUBSTRAT en Moles/1000	*Concentrations restantes Moles/1000*	*Concentrations hydrolysées Moles/1000*	*VITESSE Moles/ 1/min -1*	*1 / V*	*1 / S*
			METAMPICILLINE		
,10 . 10^{-3}	0,5 . 10^{-3}	0,5 . 10^{-3}	1,66. 10^{-3}	0,60 . 10^{6}	1 . 10^{4}
,15 . 10^{-3}	0,075. 10^{-3}	0,075. 10^{-3}	2,50. 10^{-6}	0,400. 10^{6}	6,6 . 10^{3}
,20 . 10^{-3}	0,105. 10^{-3}	0,095. 10^{-3}	3, 50 . 10^{-6}	0,286 . 10^{6}	5 . 10^{3}
,25 . 10^{-3}	0,130. 10^{-3}	0,120. 10^{-3}	4 . 10^{-6}	0,250. 10^{6}	4 . 10^{3}
,30 . 10^{-3}	0,164. 10^{-3}	0,136. 10^{-3}	4,53 . 10^{-6}	0,220. 10^{6}	3,3 . 10^{3}
,35 . 10^{-3}	0,205. 10^{-3}	0,145. 10^{-3}	4,83 . 10^{-6}	0,207 . 10^{6}	2,8 . 10^{3}
,40 . 10^{-3}	0,240. 10^{-3}	0,160. 10^{-3}	5,33 . 10^{-6}	0,187. 10^{6}	2,5 . 10^{3}
			PHENETHICILLINE		
,10 . 10^{-3}	0,048. 10^{-3}	0,052. 10^{-3}	1,73 . 10^{-6}	0,577. 10^{6}	1 . 10^{4}
,15 . 10^{-3}	0,084 . 10^{-3}	0,066. 10^{-3}	2,20 . 10^{-6}	0,454. 10^{6}	6,6 . 10^{3}
,20 . 10^{-3}	0,120. 10^{-3}	0,080. 10^{-3}	2,66 . 10^{-6}	0,376. 10^{6}	5 . 10^{3}
,25 . 10^{-3}	0,168. 10^{-3}	0,082. 10^{-3}	2,73 . 10^{-6}	0,366. 10^{6}	4 . 10^{3}
,30 . 10^{-3}	0,210. 10^{-3}	0,090. 10^{-3}	3 . 10^{-6}	0,333. 10^{6}	3,3 . 10^{3}
,35 . 10^{-3}	0,260. 10^{-3}	0,090. 10^{-3}	3 . 10^{-6}	0,333. 10^{6}	2,8 . 10^{3}
,40 . 10^{-3}	0,305. 10^{-3}	0,095. 10^{-3}	3,16 . 10^{-6}	0,316. 10^{6}	2,5 . 10^{3}
			CARBENICILLINE		
,10 . 10^{-3}	0,06 . 10^{-3}	0,04 . 10^{-3}	1,33 . 10^{-6}	0,751. 10^{6}	1 . 10^{4}
,15 . 10^{-3}	0,086. 10^{-3}	0,064 . 10^{-3}	2,13 . 10^{-6}	0,469. 10^{6}	6,6 . 10^{3}
,20 . 10^{-3}	0,132. 10^{-3}	0,068. 10^{-3}	2,26 . 10^{-6}	0,442. 10^{6}	5 . 10^{3}
,25 . 10^{-3}	0,176. 10^{-3}	0,074. 10^{-3}	2,46 . 10^{-6}	0,403. 10^{6}	4 . 10^{3}
,30 . 10^{-3}	0,210. 10^{-3}	0,090. 10^{-3}	3 . 10^{-6}	0,333. 10^{6}	3,3 . 10^{3}
,35 . 10^{-3}	0,25 . 10^{-3}	0,100. 10^{-3}	3,33 . 10^{-6}	0,300. 10^{6}	2,8 . 10^{3}
,40 . 10^{-3}	0,295. 10^{-3}	0,105. 10^{-3}	3,50 . 10^{-6}	0,285. 10^{6}	2,5 . 10^{3}

Tableau n° 10

Figure n° 13

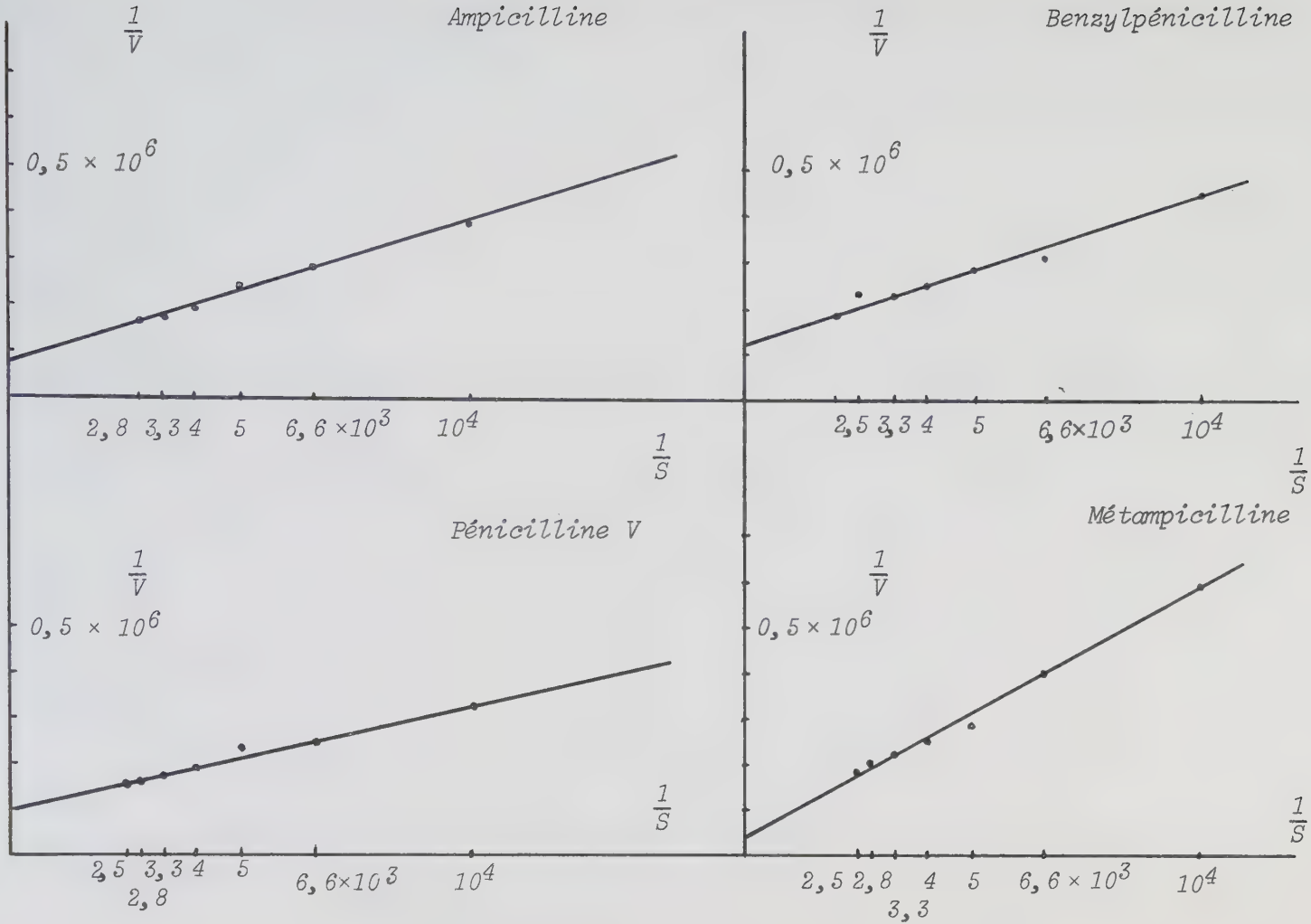
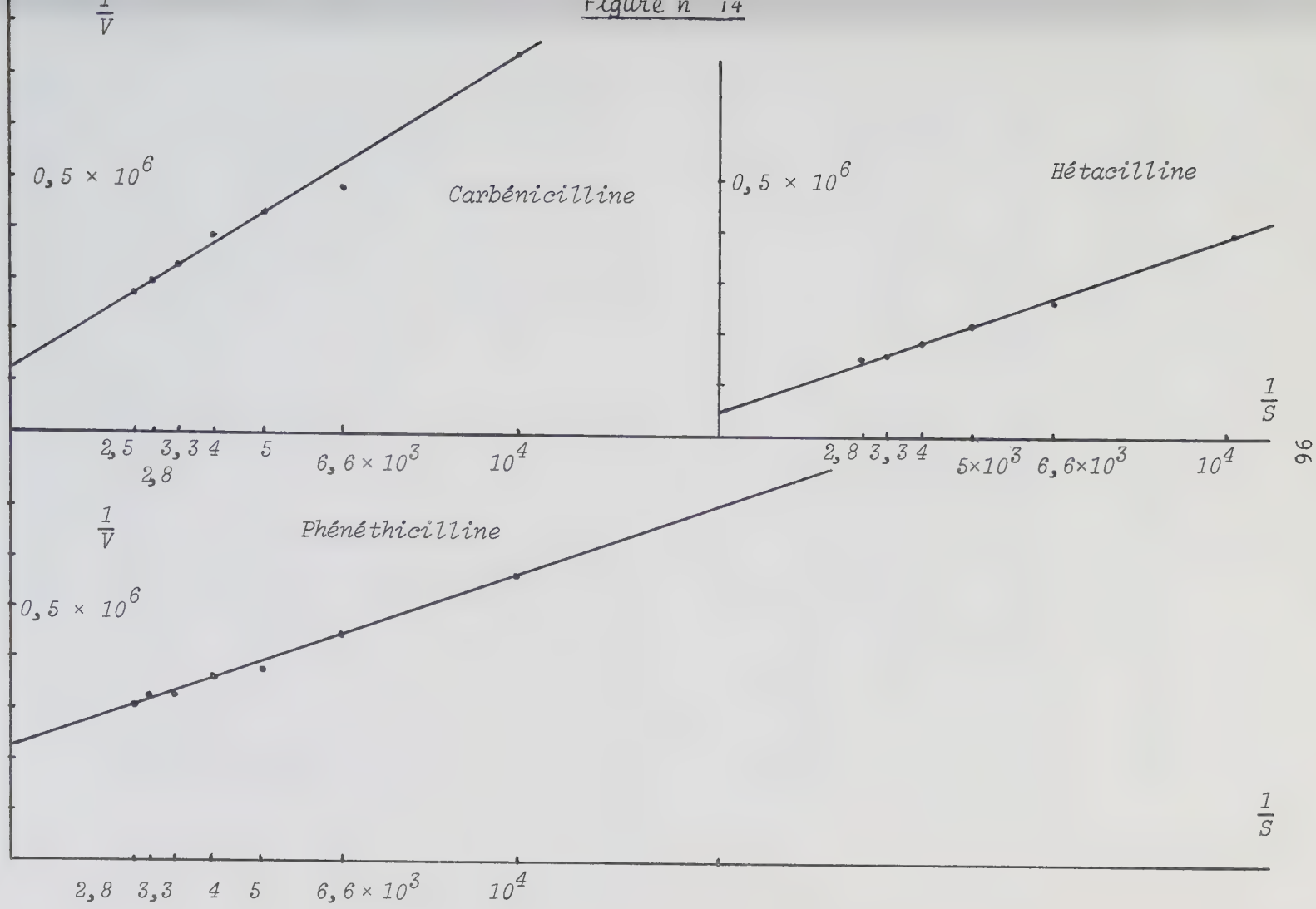

Ampicilline
1/V
0,5 × 10^6
2,8 3,3 4 5 6,6×10^3 10^4
1/S
Benzylpénicilline
1/V
0,5 × 10^6
2,5 3,3 4 5 6,6×10^3 10^4
1/S
Pénicilline V
1/V
0,5 × 10^6
2,5 3,3 4 5 6,6×10^3 10^4
2,8
1/S
Métampicilline
1/V
0,5 × 10^6
2,5 2,8 4 5 6,6 × 10^3 10^4
3,3
1/S

Figure n° 14


1/V
0,5 × 10^6
Carbénicilline
2,5
2,8
3,3
4
5
6,6 × 10^3
10^4
1/S
0,5 × 10^6
Hétacilline
2,8
3,3
4
5×10^3
6,6×10^3
10^4
1/S
1/V
Phénéthicilline
0,5 × 10^6
2,8
3,3
4
5
6,6 × 10^3
10^4
1/S

COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS A CEUX FOURNIS PAR DIFFERENTS AUTEURS.

Nous comparons les valeurs de Km précédemment déterminées à celles présentées par différents auteurs pour des β lactamases d'origines très variées.

CITRI et coll. (6) déterminent les constantes enzymatiques de Bacillus cereus (souches 569, 569/H, 5/P) par iodométrie. Pour la benzylpénicilline, il obtient les Km suivants exprimés en moles/litre :

	569	569/H	5/P
Benzylpénicilline	$4,8 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$4,3 \cdot 10^{-5}$

Tableau n° 11

JOHNSON et GHYUSEN (14) déterminent les constantes de β lactamases élaborées par différentes souches de Streptomyces, par méthode microiodométrique. Les valeurs obtenues sont exprimées en moles/litre.

Streptomyces	*R 39*	*Albus G*
Benzylpénicilline	$0,65 \cdot 10^{-4}$	$0,74 \cdot 10^{-3}$
Ampicilline	$0,57 \cdot 10^{-4}$	$0,90 \cdot 10^{-3}$
Pénicilline V	$0,28 \cdot 10^{-4}$	$0,62 \cdot 10^{-3}$
Carbécinilline	$0,26 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$

Tableau n° 12

Plus récemment R. LABIA et F. LE GOFFIC (15) déterminent les constantes Km et Vm de diverses souches bactériennes à Gram négatif par méthode *microacidimétrique* à l'aide d'un pHstat couplé à un ordinateur.

Au cours de l'hydrolyse, la formation d'acide pénicilloïque est suivie au pHstat capable de réguler le pH par introduction automatique d'une solution de NaOH 5 . 10^{-3} M, par incrément de 0,2 microlitre. La vitesse de consommation des volumes de NaOH traduisant le degré d'avancement de la cinétique enzymatique est enregistrée puis analysée sur mini-ordinateur qui donne directement les constantes de Michaelis - Menten. Les valeurs de Km exprimées en moles/litre sont les suivantes :

Tableau n° 13

	E. Coli	*E.Coli Kl2*	*Klebsiella pneumoniae*	*Serratia*
Benzylpénicilline	$0,164.10^{-4}$	$0,18 .10^{-4}$	$0,235.10^{-4}$	$0,17 .10^{-4}$
Pénicilline V	$0,09 .10^{-4}$	$0,097.10^{-4}$	$0,126.10^{-4}$	$0,097.10^{-4}$
Ampicilline	$0,26 .10^{-4}$	$0,24 .10^{-4}$	$0,303.10^{-4}$	$0,24 .10^{-4}$
Carbénicilline	$0,09 .10^{-4}$	$0,10 .10^{-4}$	$0,127.10^{-4}$	$0,13 .10^{-4}$

La grande diversité des résultats rend impossible toute comparaison.

Ces différences sont la conséquence des conditions expérimentales :

--- différence des souches étudiées d'un auteur à l'autre. Pour une même spécificité enzymatique, les constantes cinétiques diffèrent avec l'origine de l'enzyme.

--- différence dans le degré de purification des enzymes étudiées,

--- variabilité des conditions de pH, de température, de concentrations d'enzyme et de substrats engagés dans la réaction,

--- diversité des techniques analytiques utilisées : pHstat, iodométrie, microiodométrie, technique proposée par formation d'hydroxamates ferriques.

Le but de cette étude, est de proposer une méthodologie applicable à la détermination des constantes cinétiques des β lactamases.

Des études ultérieures permettront de confirmer les résultats énoncés et d'étendre l'étude des constantes cinétiques à d'autres β lactamases d'origine différentes.

-:-

ETUDE DE LA DEGRADATION DES SUBSTRATS PAR LES β LACTAMASES

ENREGISTREMENTS CONTINUS

La détermination des constantes enzymatiques Km et Vm nécessite le dosage du substrat restant après un temps de contact déterminé entre l'enzyme et le substrat. Mais il est également intéressant de connaître l'allure de la courbe de dégradation du substrat dans le temps. La méthode proposée se prête à l'enregistrement continu de la dégradation par l'enzyme d'un substrat déterminé.

De la même façon cette technique peut être appliquée à l'étude de la dégradation d'un mélange de substrats mis en contact de l'enzyme. Dans ce dernier cas il est possible, par extraction différentielles des substrats, de déterminer, à partir du mélange, le substrat préférentiel de l'enzyme.

1. COURBES DE DEGRADATION DES SUBSTRATS.

Technique.

Le prélèvement est effectué en continu, directement dans le mélange réactionnel. L'aiguille de prélèvement est débranchée du bras mobile du Sampler II. Elle est alors introduite dans le mélange enzyme-substrat placé au bain-marie. La température d'incubation est fixée en fonction de la nature de l'enzyme étudiée.

Les études de dégradation ont été réalisées entre 0 et 1500µg/ml de substrat.

Dans un Erlenmeyer sont introduits successivement :

100 ml de solution de β lactamine à 1500µg/ml
100 ml de solution enzymatique de titre déterminé

Les solutions de substrats et d'enzymes, réalisées en tampon Barbital-acétate pH 7, sont préalablement équilibrées à la température d'incubation.

Immédiatement après mélange des deux solutions, l'aiguille de prélèvement est introduite dans le mélange. Le point de départ, sur l'enregistrement, correspond à la concentration initiale du mélange réactionnel soit 750 µg/ml de substrat. Au même instant on déclenche un chronomètre pour repérer le temps sur le papier d'enregistrement.

Les courbes enregistrées en transmission sont ensuite transcrites en densités optiques. On construit alors la courbe de variation de la concentration en substrat (D.O.) en fonction du temps sur papier millimétré.

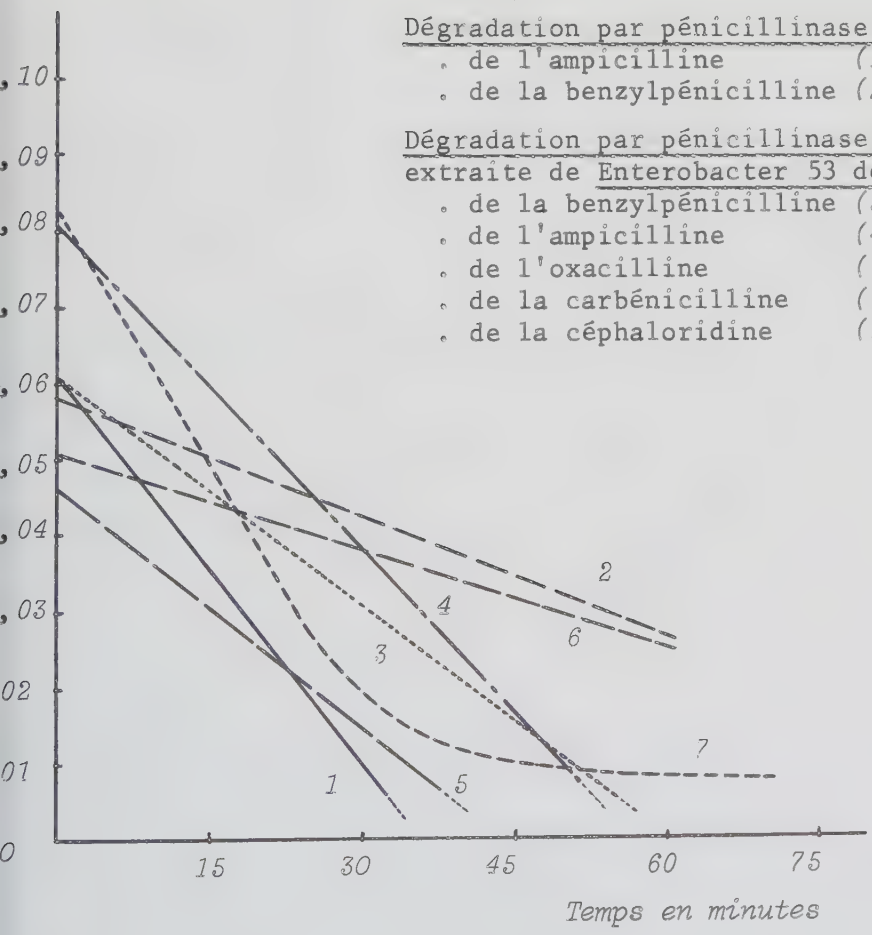
(Figure n° 15)

Figure n° 15

Cinétique de dégradation des substrats

Enregistrements continus

ensités optiques



APPLICATIONS.

Nous avons appliqué cette technique à la détermination des cinétiques de dégradation de divers substrats par deux enzymes :

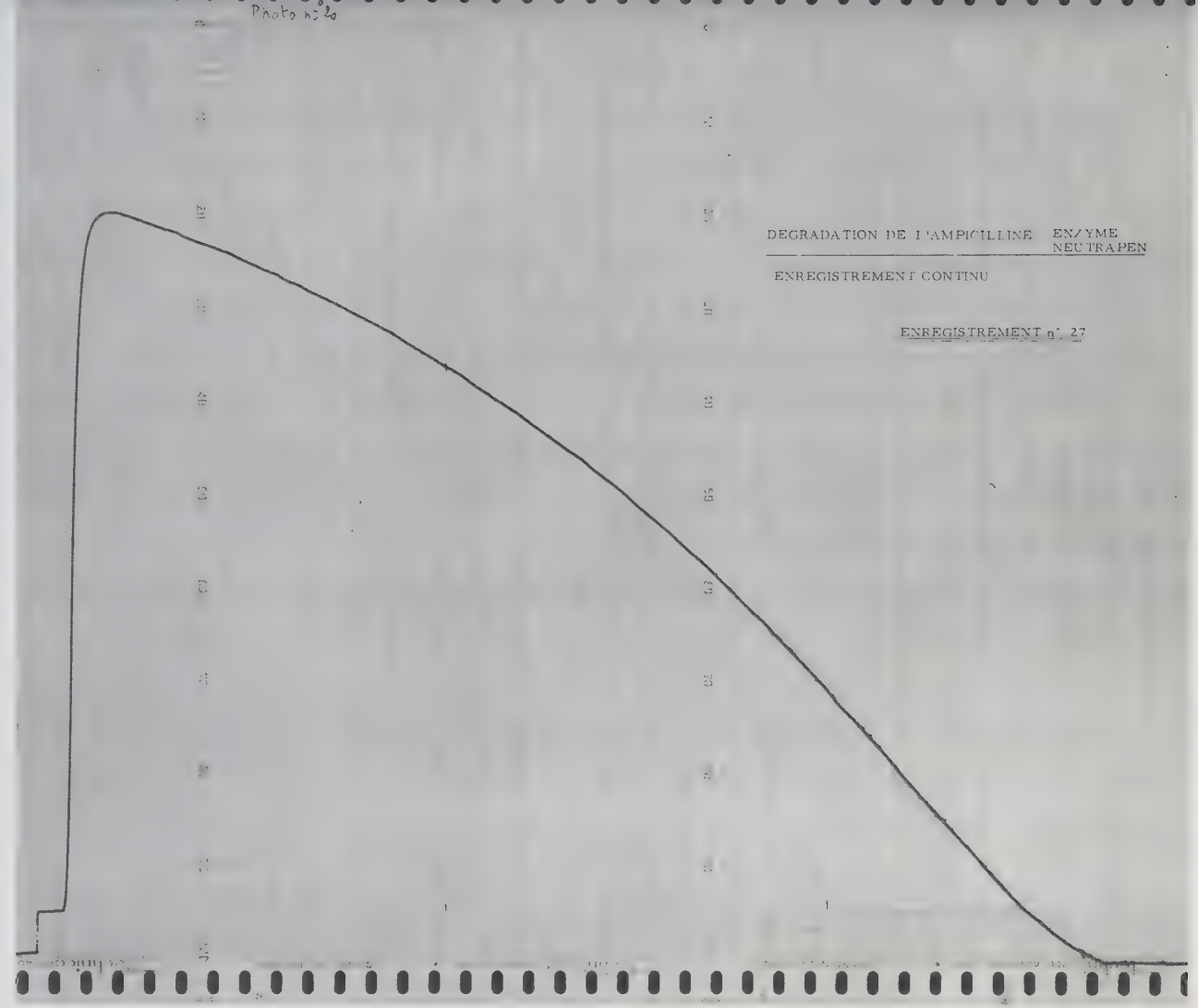
. le Neutrapen antérieurement cité,

. la β Lactamase de l'Enterobacter cloacae 53 de Smith. L'extraction a été réalisée au Laboratoire par GOURMELON (11).

Les cinétiques de dégradation sont les suivantes :

Neutrapen	*Substrat*	*Concentration enzymatique*	*Température incubation*	*pH*	*t*
Benzylpénicilline	2000µg/ml	40 U/ml	25°	7	40'
Ampicilline (enregistrement n°27)	2000µg/ml	40 U/ml	25°	7	>75'

Photo n°20



DEGRADATION DE L'AMPICILLINE ENZYME NEUTRAPEN

ENREGISTREMENT CONTINU

ENREGISTREMENT n°. 27

Smith 53	*Substrat*	*Dilution extrait enzymatique*	*T*	*pH*	*t*
Benzylpénicilline	2500 µg/ml	1/200^{e}	37°	6	65'
Ampicilline	2500 mcg/ml	1/200^{e}	37°	6	60'
Carbénicilline	2500 mcg/ml	1/50^{e}	37°	6	120'
Oxacilline	2500 mcg/ml	1/50^{e}	37°	6	40'
Céphaloridine	2500 mcg/ml	1/200^{e}	37°	6	

La transcription D.O./temps en échelles arithmétiques permet d'observer une courbe linéaire qui chute asymptotiquement vers l'axe des abscisses au fur et à mesure de l'épuisement du substrat.

La courbe relative à la Céphaloridine (fig. n° 10 - Courbe 7) est l'exemple parfait de cette cinétique. La benzylpénicilline, l'ampicilline, l'oxacilline (fig. n° 8 - courbes 1, 3, 4, 5), présentent des cinétiques identiques mais la chute asymptotique est plus proche de l'axe des abscisses, contrairement à ce qui se passe pour la céphaloridine.

II. DEGRADATION D'UN MELANGE DE DEUX SUBSTRATS.

Nous avons étudié la cinétique de dégradation du mélange benzylpnéicilline - ampicilline par la β lactamase de l'Enterobacter 53 Smith. Le choix de ces deux substrats a été réalisé en fonction des possibilités de leur séparation par extractions différentielles.

Mélange réactionnel.

Solution de Benzylpénicilline à 400µg/ml ..... 100 ml

Solution d'Ampicilline à 400µg/ml ..... 100 ml

Solution enzymatique : extrait enzymatique dilué au 1/100ème ..... 200 ml

Le mélange réactionnel correspond donc à 1000 µg/ml de Benzylpénicilline et 1000 µg/ml d'Ampicilline.

Au temps 0 l'aiguille de prélèvement est introduite dans le mélange réactionnel placé au Bain-marie à 37°. Toutes les 15 mn un aliquot du mélange réactionnel, soit 20 ml, est prélevé pour déterminer les concentrations respectives des deux substrats.

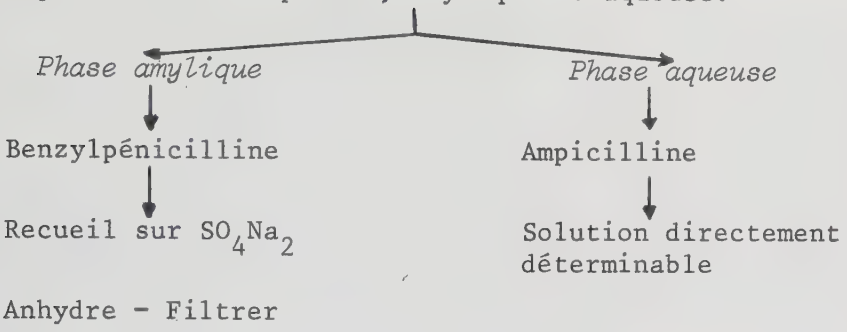
Technique d'extraction.

L'Ampicilline n'est pas extractible par les solvants organiques au contraire de la plupart des autres β lactamines. Ceci permet donc le dosage différentiel d'un mélange des deux composés.

Nous avons pratiqué le mode opératoire suivant :

- Dans une ampoule à décanter introduire 20 ml de solution de β lactamine. Ajuster à pH 2 par 5 ml de tampon glycine (pH 1,5) (tampon de Kavanagh). Mélanger et introduire dans l'ampoule 20 ml d'acétate d'iso-amyle. Agiter. Laisser reposer.

- Séparer les deux phases, amylique et aqueuse.



- La phase amylique déshydratée est récupérée. Dans une ampoule à décanter elle est mise en contact avec une solution alcaline de carbonate acide de Na à 2 pour cent. On agite, puis laisse reposer. En milieu alcalin la Benzylpénicilline passe de la phase amylique à la phase aqueuse, sous forme de pénicillinate de sodium. La solution aqueuse se prête donc au dosage direct de la Benzylpénicilline.

La composition du tampon glycine pH 1,5 de Kavanagh est la suivante :

Glycocolle	45 g
HCl pur	50 ml
H_2O q.s.p.	1000 ml

Résultats.

Les extractions différentielles conduisent aux résultats suivants :

Q restante : concentrations restantes
Q HOH : concentrations hydrolysées
µM HOH : micromoles hydrolysées.

Tableau n° 14

Temps	*Ampicilline*			*Benzylpénicilline*		
	Q restante	*Q HOH*	*µM HOH*	*Q restante*	*Q HOH*	*µM HOH*
Témoin	950	-	-	1000	-	-
15'	850	100	0,26	850	150	0,42
30'	750	200	0,52	600	400	1,12
45'	650	300	0,78	300	700	1,96
60'	425	525	1,41	0	1000	2,80
75'	150	800	2,08	0	-	-
90'	0	950	2,47	0	-	-

Du point de vue graphique on constate deux temps dans la dégradation de chaque substrat. La dégradation de la Bensylpénicilline est beaucoup plus rapide que celle de l'Ampicilline. La Benzylpénicilline semble être préférentiellement dégradée par la β lactamase. La seconde pente de dégradation de l'Ampicilline s'amorce dès que la Benzylpénicilline est totalement dégradée (Figure n° 15).

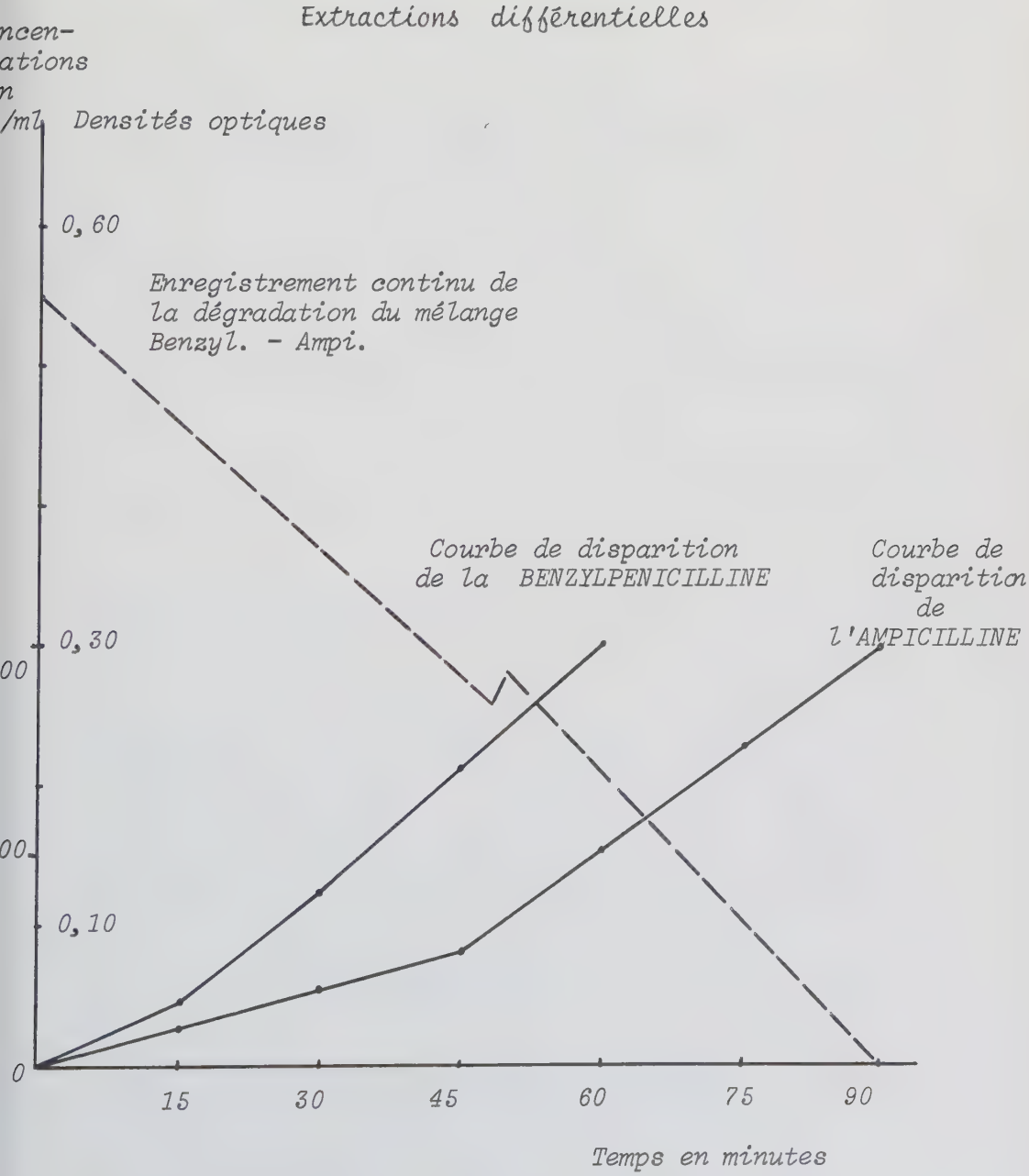
L'enregistrement continu de la dégradation par la β lactamase de la somme Benzylpénicilline + ampicilline accuse un décrochage au même niveau : disparition de la Benzylpénicilline et amorce de la deuxième étape de dégradation de l'Ampicilline (Figure n° 16).

-:-

Figure n° 16

Dégradation du mélange Benzylpénicilline - Ampicilline

Extractions différentielles



DETERMINATION DES PROFILS D'ACTIVITE β LACTAMASIQUE DE DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES

Les études précédentes ont été réalisées à l'aide d'un enzyme purifiée : la β lactamase de Bacillus cereus.

Mais il est également intéressant de connaître le comportement du germe entier devant une série de subtrats β lactamines pour apprécier sa résistance ou sa sensibilité.

On peut alors dresser un profil de cette réponse ou de ce comportement. Nous verrons que celui-ci peut être différent de celui de l'enzyme purifiée.

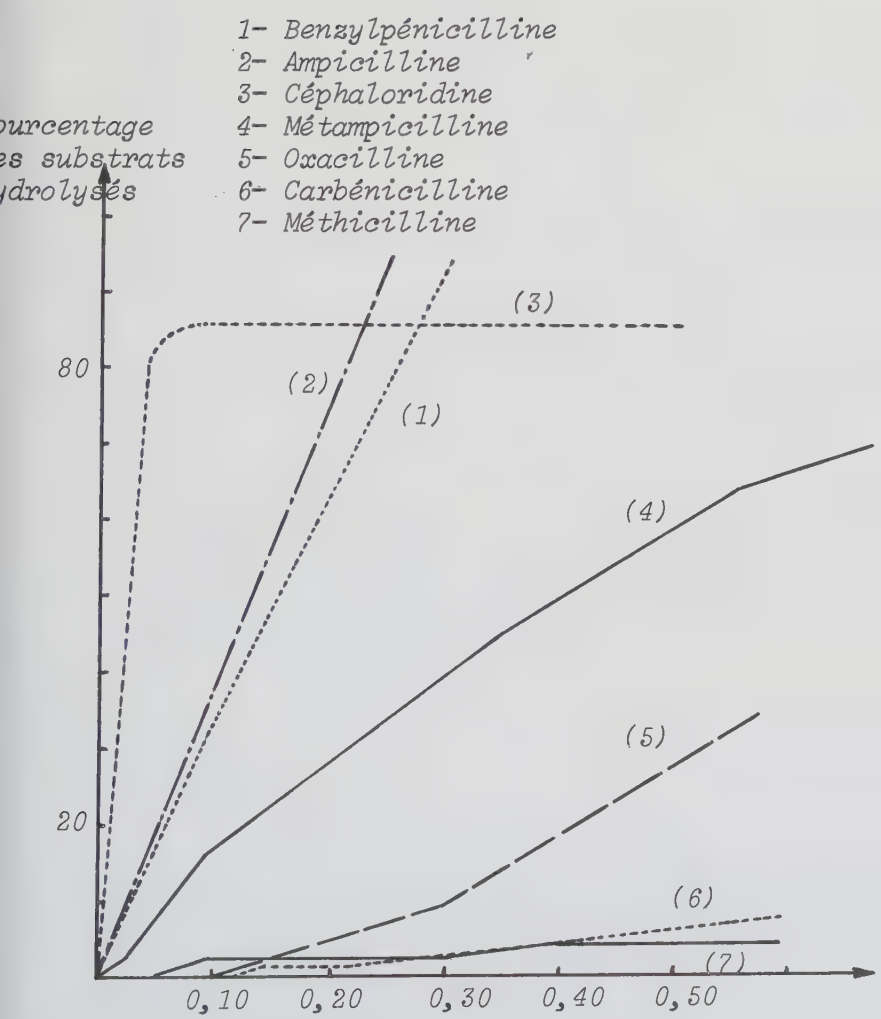
La pratique des profils n'a de valeur que si l'on établit une comparaison entre les différentes souches testées dans les mêmes conditions expérimentales. Si l'on se place dans des conditions de temps, de concentrations de germes, de concentrations en substrats, la variation d'un paramètre entraîne une modification de l'allure du profil qui est fonction de la cinétique de dégradation de chaque substrat (Courbes de dégradations en fonction du poids de germes) (Fig. n° 17).

Les déterminations de profils ont été réalisées dans les conditions expérimentales suivantes :

- *Quantité de germes*, évaluée en mg de poids sec de germes par ml de suspension bactérienne.

Figure n° 17

Variations des pourcentages d'hydrolyse
en fonction du poids sec de germes



(Smith 53)
"quantités de germes"
exprimées en mg de poids sec/ml

Nous travaillons à poids constant de germes pour toutes les espèces testées, soit : *1 mg de poids sec par ml.*

L'évaluation est réalisée par mesure néphélométrique comparativement à une courbe d'étallonnage. Des contrôles gravimétriques sont effectués après déshydratation d'un volume connu de suspension bactérienne.

- *Solutions de* β lactamines : elles sont réalisées à la concentration de 1500 µg/ml, converties en micromoles par ml.

  Les β lactamines utilisées sont les suivantes :

Benzylpénicilline	Ampicilline	Métampicilline
Oxacilline	Méthicilline	Phénéthicilline
Carbénicilline	Céphaloridine	

  Les solutions sont effectuées en tampon Barbital-Acétate pH 7.

- *Temps de contact :* par commodité, nous l'avons fixé à une heure. Dans ces conditions opératoires constantes, les quantités d'antibiotiques dégradées sont exprimées en : *micromoles par heure et par mg de poids sec de germes.* La vitesse de dégradation demeure constante pour un temps nettement supérieur au temps choisi. $V = f(t) = \text{constante}$.

Technique.

Les profils obtenus traduisent les proportions de dégradation pour chaque antibiotique. La quantité de substrat dégradé est évaluée par différence entre la concentration initiale et la concentration finale après contact avec les germes. Les souches sont mises en culture en bouillon BPG durant 18 h. au bain-marie à 37°. On assure une agitation permanente, favorable à la croissance bactérienne.

Les cultures subissent ensuite une centrifugation à 12000 tours/mn, la température étant maintenue à + 4°.

Après séparation du bouillon de culture, les germes sont récupérés et mis en suspension en tampon pH 7. La concentration est ajustée à 1 mg de poids sec/ml au spectrophotomètre à 670 nm.

La mise en contact des germes (Resting-cells) et des antibiotiques est opérée immédiatement par mélange à volumes égaux de la suspension et des solutions antibiotiques.

suspension bactérienne	2 ml
solutions antibiotiques	2 ml

Pour les germes producteurs d'exopénicillinases, l'activité enzymatique se retrouve dans le surnageant de culture alors que les germes ne présentent pas d'activité. Pour apprécier cette activité, nous réalisons la suspension bactérienne dans le bouillon ayant servi à la culture BPG. L'activité enzymatique présentée par 1 ml de surnageant correspond donc à 1 mg de poids sec de germes. Les germes sont ensuite séparés du surnageant par centrifugation. Seul le surnageant est utilisé pour la détermination de l'activité enzymatique.

Le contact germes-substrat est réalisé en tubes plastiques souples au bain-marie à 37°. Ces tubes sont directement centrifugés en centrifugeuse réfrigérée à + 4°, à la vitesse de 12000 tours/mn.

On détermine les concentrations de β lactamines restantes dans les surnageants. L'activité β lactamasique est ainsi appréciée par différence entre la concentration initiale et la concentration finale.

Dans les cas des exopénicillinases, les solutions d'incubation : BPG + solutions antibiotiques sont directement déterminées après blocage de l'activité enzymatique dans un bain de glace. Le bac de rinçage du Sempler II est alimenté dans ce cas par du bouillon BPG dilué au 1/2 dans du tampon Barbital-acétate pH 7.

ACTIVITE β LACTAMASIQUE.

Les concentrations de β lactamines sont déterminées comparativement à des courbes d'étalonnages enregistrées dans les mêmes conditions opératoires.

Une courbe est réalisée pour chaque substrat.

Pour chaque germe, les surnageants sont testés successivement. On enregistre ainsi le profil de dégradation des différents substrats. Après mesure, les quantités dégradées sont exprimées en pourcentages d'activité par rapport aux concentrations initialement introduites.

La figure n° 18 représente deux enregistrements superposés :

- en pointillé : les concentrations initiales témoins
- en trait plein : un exemple de dégradation pour un germe donné (Pyocyanique Ber).

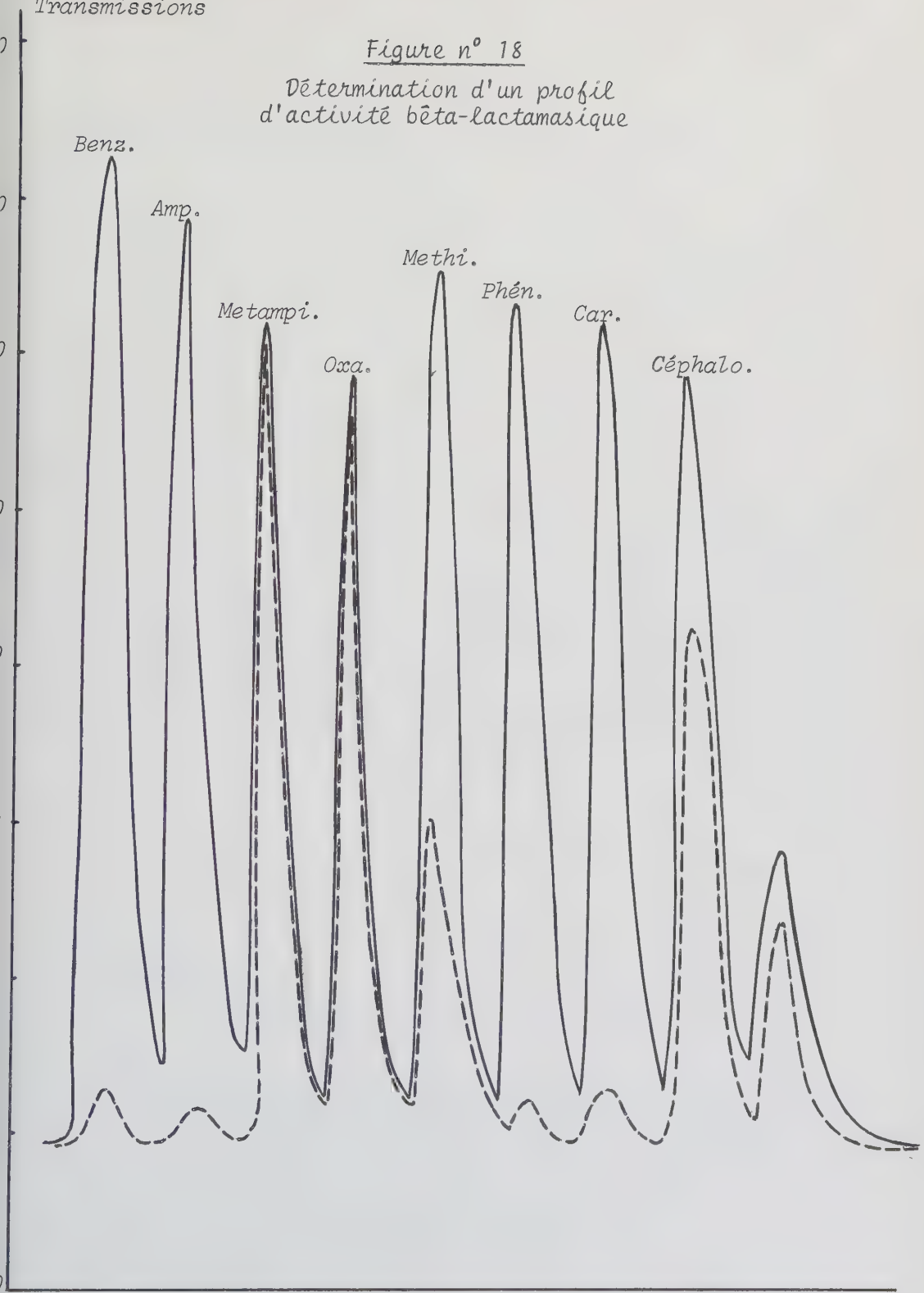
Les proportions de dégradation sont les suivantes :

Benzylpénicilline	96 %	Méthicilline	0 %
Ampicilline	96 %	Phénéthicilline	91 %
Métampicilline	69 %	Carbénicilline	96 %
Oxacilline	6 %	Céphaloridine ..	40 %

ce que l'on peut représenter de la façon suivante : profil d'activité.

Figure n° 18

Détermination d'un profil d'activité bêta-lactamasique



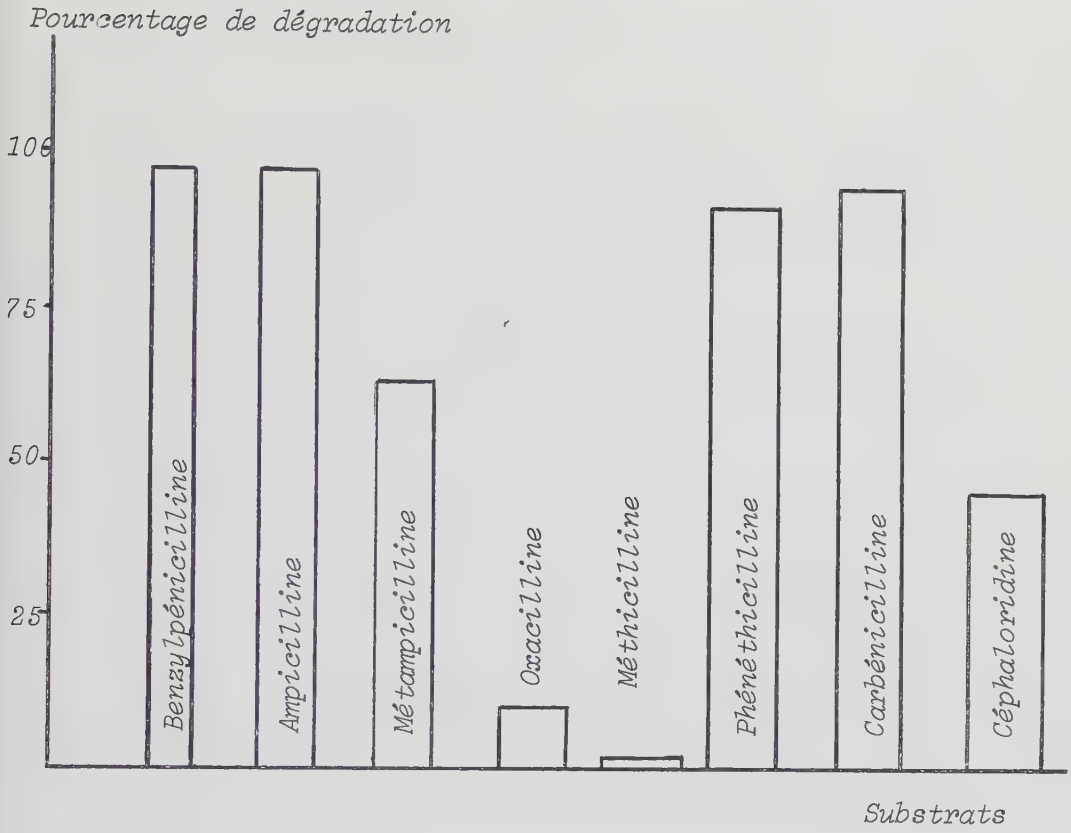


Figure n° 19 - Profil d'activité du Pyocyanique Ber

Résultats.

Etude de 64 souches bactériennes.

1. *Les résultats* sont présentés sous forme de tableaux, les germes étant classés par genre bactérien.

Tableaux N° 15 à 25

2. Interprétation globale des résultats.

Il n'est pas possible de dresser un *profil type* par genre bactérien. Le comportement d'un substrat devant les différents germes est beaucoup plus lié à la β lactamase qu'au genre bactérien. C'est une question de niveau d'activité, fonction de l'activité pénicillinasique et non du genre bactérien.

Dans les conditions opératoires décrites, nous pouvons distinguer en prenant pour base de comparaison les deux β lactamines, les plus sensibles aux pénicillin ases : Benzylpénicilline et Ampicilline, les 5 groupes suivants :

- *Germes qui ne dégradent aucune β lactamine :* 31,6 pour cent.
- *Germes qui dégradent la totalité de métampicilline, ampicilline, benzylpénicilline :* 6,6 pour cent.
- *Germes dégradant la totalité d'ampicilline et de benzylpénicilline :* (de 96 à 100 pour cent) et qui ne dégradent que 50 à 70 pour cent de métampicilline : 16,6 pour cent.
- *Germes qui dégradent plus de métampicilline que de benzylpénicilline et d'ampicilline :* 16,6 pour cent.
- *Germes qui hydrolysent de façon comparable la métampicilline, la benzylpénicilline ou l'ampicilline :* 28 pour cent.

Cette étude comparative a été réalisée dans le but de déterminer le comportement de la Métampicilline devant l'activité β lactamasique de germes entiers.

Nous constatons que 30 pour cent des germes testés ne présentent aucune activité β lactamasique bien que la plupart d'entre eux soient résistants à la benzylpénicilline selon la technique de l'antibiogramme par diffusion en gélose.

La résistance des germes aux β lactamines fait intervenir d'autres mécanismes que la pénétration des β lactamines dans les cellules bactériennes.

Ainsi les profils réalisés sur le germe entier et sur le produit de son ultrasonnat peuvent être différen ts (U.S.).

Nous avons constaté l'existence d'un délai de pénétration des substrats dans les bactéries correspondant à 15 - 20 mn. Les cinétiques de dégradation de ce substrat sont ensuite comparables à celles de l'ultrasonnat.

3. Interprétation par genre bactérien.

Enterobacter.

Les souches testées hydrolysent la benzylpénicilline et l'ampicilline. Par contre, méthicilline et oxacilline sont très peu dégradées.

La céphaloridine se comporte de façon variable. La carbénicilline est peu hydrolysée sauf dans un cas où l'on note 45 % d'hydrolyse.

Moraxella.

A une exception près, Moraxella Tho., les souches n'hydrolysent pas les substrats étudiés.

Serratia.

On distingue deux catégories de souches : Les Serratia Rib., Dan., hydrolysent la plupart des substrats proposés y compris la céphaloridine. Les Serratia Laf., Cau., présentent une activité dégradante beaucoup plus réduite qui porte sur la céphaloridine essentiellement.

Salmonella.

Les souches testées n'hydrolysent pas les substrats proposés. On doit signaler une exception, Salmonella Cha. qui ne dégrade que la Carbénicilline (80 % d'hydrolyse).

Pseudomonas.

A l'exception de Pseudomonas Ber., les souches testées n'hydrolysent pas les β lactamines étudiées.

Klebsiella.

L'activité dégradante est très variable, les souches sont très actives ou peu actives.

Staphylocoques.

Les souches étudiées présentent une activité enzymatique très importante.

E. Coli.

Les souches sauvages utilisées ne présentent aucune activité β lactamasique.

Proteus.

Le comportement, très variable, est comparable à celui des Klebsiella.

En raison de la diversité de comportement des souches au sein de chaque genre, il paraît impossible de dresser le profil type de chaque genre bactérien.

Pour ces raisons, divers auteurs ont proposé une classification des β lactamases.

JACK et RICHMOND ont décrit 8 types de β lactamases (11) parmi 46 souches testées vis-à-vis de la benzylpénicilline, l'ampicilline, la céphaloridine et ont recherché leur inhibition à la cloxacilline et leur sensibilité au pCMB.

Cette classification a été depuis lors réduite aux quatre grands groupes suivants :

Type I :

Enzymes actives principalement sur les céphalosporines, inhibées par la cloxacilline et insensibles à l'action du pCMB.

Type II :

Enzymes actives surtout sur les pénicillines, inhibées par la cloxacilline et insensibles à l'action du pCMB.

Type III :

Enzymes présentant un profil variable. Le rapport activité pénicilline/activité céphalosporine est peu éloigné de 1, inhibées par la cloxacilline mais non par le pCMB.

Type IV :

Enzymes à profil semblable à celui du type III, résistantes à l'inhibition par la cloxacilline, mais peu sensibles au pCMB.

Nous n'avons pas étudié l'inhibition de la résistance par la cloxacilline et le pCMB. Par contre, nous avons testé un plus grand nombre de dérivés Benzylpénicilline, Ampicilline, Métampicilline, Oxacilline, Méthicilline, Phénéthicilline, Carbénicilline et Céphaloridine.

Nos résultats nous permettent de définir les types de β lactamases suivants :

Type A :

Enzymes qui hydrolysent les β lactamines du groupe *Benzyl, Ampi et Métampicilline : Klebsiella Bat.* par exemple; elles correspondent au type II de RICHMOND.

Type B :

Enzymes qui dégradent les β lactamines du groupe Benzyl, Ampi, Métampi, mais qui hydrolysent également la *Céphaloridine : Enterobacter Ber.* par exemple; elles correspondent au groupe I de RICHMOND. Elles sont actives sur les céphalosporines.

Type C :

Enzymes qui dégradent, en plus des substrats précédents : Benzyl, Ampi, Métampi, Céphalosporine, les β lactamines du groupe de la *Méthicilline* et de l'*Oxacilline :* Klebsiella Mai., Staphylocoque Ribi.

Type D :

Enzymes qui dégradent les mêmes substrats que les enzymes du groupe C, mais qui dégradent en plus la *Carbénicilline*.

Exemples : J_5 R_{48} J_5 R_{309}, Proteus Lar., Serratia Rib.

(Enregistrement n° 29)

Type E :

Enzyme qui hydrolyse exclusivement la *Carbénicilline : Salmonella Cha.* par exemple.

(Enregistrement n° 30)

Type F :

Enzyme qui hydrolysent presque exclusivement la Céphaloridine; Serratia Cau., Klebsiella And. par exemple.

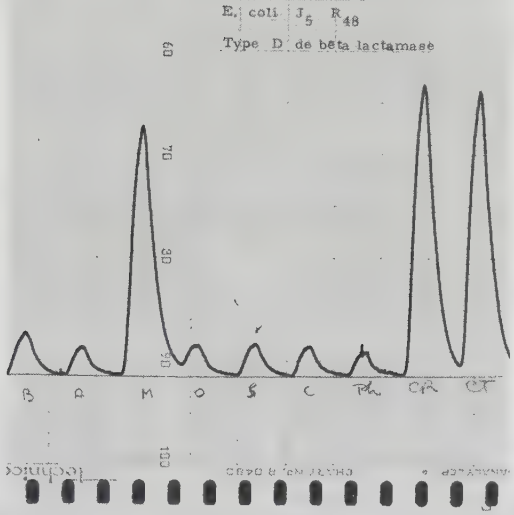
Dans cette classification, nous constatons que :

. Les enzymes céphalosporinases, enzymes de *type B* sont actives également sur la plupart des pénicillines.

ENREGISTREMENT n° 28

E. coli J_5 R_{48}

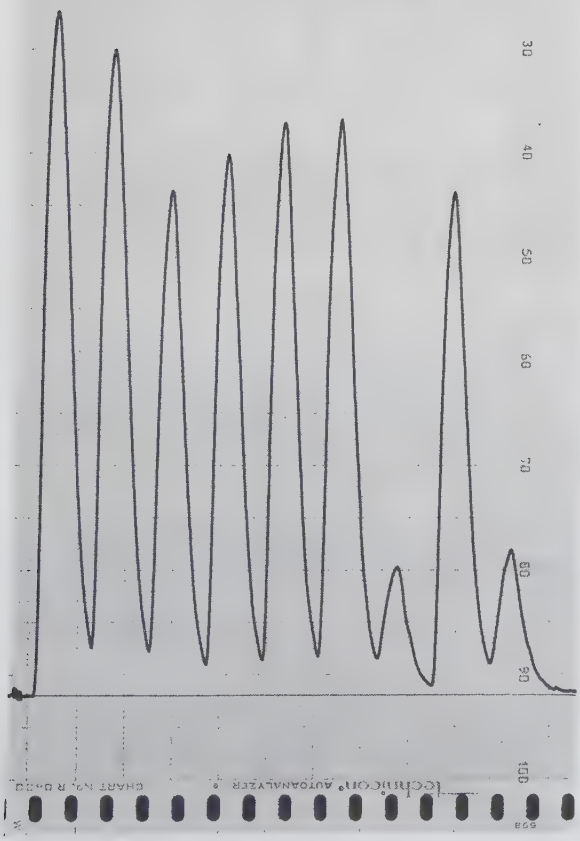
Type D de bêta lactamase



ENREGISTREMENT n° 29

Salmonella cha.

Type E de bêta lactamase



Par contre, les céphalosporinases de *type F* sont très peu actives sur les pénicillines.

. L'hydrolyse de la Carbénicilline par les enzymes de type D est accompagnée de l'hydrolyse d'autres β lactamines.

Par contre, les enzymes de type E n'hydrolysent aucune autre β lactamine.

. L'hydrolyse des β lactamines du groupe de l'oxacilline, méthicilline, est toujours liée à l'hydrolyse de la benzyl-pénicilline et de l'ampicilline.

La technique proposée se prête à une vaste étude de souches bactériennes vis-à-vis de nombreuses β lactamines. Elle permet d'isoler des souches qui présentent des enzymes particulièrement intéressantes, telle la souche *Salmonella Cha.* qui fera l'objet de prochains travaux.

Cette technique des profils a été appliquée à des études de transfert de β lactamases (plasmides transférables) entre souches bactériennes. La technique des profils d'activité est appliquée à trois types de souches bactériennes :

- *souche réceptrice :* dépourvue d'activité β lactamasique
- *souche donneuse :* présentant une activité β lactamasique vis-à-vis de certains substrats
- *souche recombinée :* après transfert, la souche réceptrice héberge le plasmide qui s'exprime phénotypiquement.

Cette étude a fait l'objet de la thèse de B. DESSAUT (7). La discussion des résultats déborderait le cadre de notre travail. Nous renvoyons donc à l'ouvrage correspondant.

-:-

KLEBSIELLA		Benzyl-pénicilline	Ampicilline	SUVIPEN	Oxacilline	Méthicilline	Phéné-thicilline	Carbéni-cilline	Céphalo-ridine
Klebsiella Bat.	Micromoles dégradées	0,92	1,08	0,68	0	0	0,22	0	0
Péni : R Ampi : R	% de dégradation	43	50	33	0	0	11	0	0
Klebsiella Per.	Micromoles dégradées	2,03	2,06	1,30	0	0	1,76	1,70	0,86
Péni : R Ampi : R	% de dégradation	96	96	63	0	0	94	96	47
Klebsiella And.	Micromoles dégradées	0,56	0,28	0,41	0	0	0	0	0,74
Péni : R Ampi : R	% de dégradation	26	13	20	0	0	0	0	40
Klebsiella Fru.	Micromoles dégradées	0	0	0,55	0	0	0	0	0
Péni : R Ampi : R	% de dégradation	0	0	26	0	0	0	0	0
Klebsiella Sab.	Micromoles dégradées	0,056	0,25	0,48	0	0	0	0	0
Péni : R Ampi : R	% de dégradation	2	11	23	0	0	0	0	0
Klebsiella Ang.	Micromoles dégradées	0	0,35	0,60	0	0	0	0	0
Péni : R Ampi : R	% de dégradation	0	11	29	0	0	0	0	0
Klebsiella L*	Micromoles dégradées	2,10	2,14	2,06	0,30	0	1,86	1,77	1,81
(U.S.	% de dégradation	100	100	100	16	0	100	100	100
Klebsiella 5*	Micromoles dégradées	0,89	1,06	0,56	0	0	0,31	0	0
(U.S.)	% de dégradation	42	50	27	0	0	16	0	0
Klebsiella Mai.	Micromoles dégradées	1,23	1,25	1	1,32	0,12	0,92	0,38	0,76
(U.S.	% de dégradation	58	58	48	76	6	49	21	42

PSEUDOMONAS FLAVOBACTERIUM		Benzyl-pénicilline	Ampicilline	SUVIPEN	Oxacilline	Méthicilline	Phénéthicilline	Carbénicilline	Céphalomidine
Pseudomonas Rib.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0
Pseudomonas Lav	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0
Flavobacterium Cha.	Micromoles dégradées	0,42	0,21	0	0,05	0	0,12	0	0,24
	% de dégradation	20	10	0	2	0	6	0	13
Pseudomonas Ber.	Micromoles dégradées	2,06	2,10	1,40	0,13	0	1,70	1,71	0,74
	% de dégradation	96	96	69	6	0	91	96	40
Pseudomonas Ref.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	00	0
Pseudomonas Pau.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0
Pseudomonas Fle. (U.S.)	Micromoles dégradées	0,126	0,128	0,192	0,135	0,136	0,120	0,082	0,036
	% de dégradation	6	5	9	6	6	6	4	2
Pseudomonas Cam. (U.S.)	Micromoles dégradées	0,112	0,085	0,129	0,067	0,23	0,062	0,35	0,12
	% de dégradation	6	4	6	4	13	3	19	6

ESCHERICHIA COLI		Benzylpénicilline	Ampicilline	SUVIPEN	Oxacilline	Méthicilline	Phénéthicilline	Carbénicilline	Céphalorédine
Escherichia coli Mar.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
Péni : R Ampi : S	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0
Escherichia coli Mas.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
Péni : R Ampi : S	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0
Escherichia coli Lab.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
Péni : R Ampi : S	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0
Escherichia coli Bay.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
Péni : R Ampi : S	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0
Escherichia coli Cera	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
Péni : R Ampi : R	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0
Escherichia coli Gal.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
Péni : R Ampi : S	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0
Escherichia coli Cam.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
(U.S.)	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0
Escherichia coli 35	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
(U.S.)	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0

PROTEUS PROVIDENCE		Benzyl-pénicilline	Ampicilline	SUVIPEN	Oxacilline	Méthicilline	Phénéthicilline	Carbénicilline	Céphalomidine
Proteus Mir. Rou.	Micromoles dégradées	0	0,071	0,47	0	0	0	0	0
	% de dégradation	0	3,3	22	0	0	0	0	0
Providence Bel.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteus Morganii Ald.	Micromoles dégradées	0	1,71	0,60	0	0	0	0	0,18
	% de dégradation	0	79	29	0	0	0	0	10
Proteus Rettgeri Sch.	Micromoles dégradées	0	0,14	0,55	0,05	0	0	0	0,24
	% de dégradation	0	6,5	26	2	0	0	0	13
Proteus Rettgeri Ler	Micromoles dégradées	2,06	2,11	1,40	0,49	0,17	1,80	1,68	1,10
	% de dégradation	98	98	68	28	10	96	94	60
Proteus vulgaris Neg	Micromoles dégradées	0,62	1	0,54	0	0	0	0	0,89
	% de dégradation	30	42	26	0	0	0	0	49
Providence Gar.	Micromoles dégradées	1,54	1,20	0,41	0	0	0,24	0,29	1,03
	% de dégradation	50	54	20	0	0	12	15	56
Proteus 48 (U.S.)	Micromoles dégradées	1,36	1,38	1,24	1,10	0,30	1,18	1,12	0,85
	% de dégradation	64	64	60	64	16	64	62	46
Proteus mirabilis Ref. (U.S.)	Micromoles dégradées	1,23	1,25	1,14	0,49	0,21	1,09	1	0,84
	% de dégradation	59	58	55	28	12	58	55	46

SERRATIA SALMONELLA		Benzyl-pénicilline	Ampicilline	SUVIPEN	Oxacilline	Méthicilline	Phénéthicilline	Carbénicilline	Céphalo-ridine
Serra tia Rib.	Micromoles dégradées	2,05	2,06	1,51	1,64	0,43	1,80	1,70	1,03
	% de dégradation	96	96	73	95	24	96	95	56
Serratia Laf.	Micromoles dégradées	0	0	0,41	0	0	0	0	0,74
	% de dégradation	0	0	0,41	0	0	0	0	0,74
Serratia Dan	Micromoles dégradées	2,04	2,06	1,20	0	0	0,32	0	0,70
	% de dégradation	96	96	58	0	0	17	0	37
Salmonella Cha.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	1,44	0
	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	81	0
Salmonella Mer. Typhi.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0
Salmonella Mou. Typhi.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0
Salmonella Moul. Typhi.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0
Serratia Cau.	Micromoles dégradées	0,21	0,21	0,10	0	0	0	0	1,10
	% de dégradation	10	9	5	0	0	0	0	60
Salmonella Moul. para A.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
	% de dégradation	0	0	0	0	0	0	0	0

ENTEROBACTER		Benzyl-pénicilline	Ampicilline	SUVIPEN	Oxacilline	Méthicilline	Phénéthicilline	Carbénicilline	Céphaloridine
Enterobacter Bar.	Micromoles dégradées	1,96	2,10	1,30	0,09	0	0,57	0,13	1,15
Péni : R Ampi : R	% de dégradation	93	98	63	5	0	30	7	63
Enterobacter Fin.	Micromoles dégradées	2,06	2,07	1,18	0,03	0	1,34	0,33	0,45
Péni : R Ampi : R	% de dégradation	98	96	57	1,6	0	72	19	24
Enterobacter Gut.	Micromoles dégradées	1,57	0,74	0,68	0	0	0,47	0	0,86
Péni : R Ampi : R	% de dégradation	75	34	33	0	0	24	0	47
Entérobacter Test.	Micromoles dégradées	2,04	2,06	1,06	0,20	0	1,80	0,80	0,74
Péni : R Ampi R	% de dégradation	96	96	51	11	0	96	45	40
Enterobacter Com.	Micromoles dégradées	0	0	0,41	0	0	0	0	0,26
Péni : R Ampi : R	% de dégradation	0	0	20	0	0	0	0	14
Enterobacter 53 Smith (U.S.)	Micromoles dégradées	2,10	2,14	2,06	0,82	0,60	1,86	0,36	1,81
	% de dégradation	100	100	100	48	34	100	20	100
Enterobacter Tec. (U.S.)	Micromoles dégradées	1,05	1,07	0,96	0,25	0,16	0,93	0,50	0,71
	% de dégradation	50	50	46	14	8	50	27	38

STAPHYLOCOQUES		*Benzyl-pénicilline*	*Ampicilline*	*SUVIPEN*	*Oxacilline*	*Méthicilline*	*Phénéthicilline*	*Carbénicilline*	*Céphalo-ridine*
Staphylocoque 59	Micromoles dégradées	2,10	2,14	2,06	0	0	1,86	1,56	0
	% de dégradation	*100*	*100*	*100*	*0*	*0*	*100*	*88*	*0*
Staphylocoque Rib.	Micromoles dégradées	2,10	2,14	2,06	0	0	1,86	1,56	0
	% de dégradation	*100*	*100*	*100*	*0*	*0*	*100*	*88*	*0*
Staphylocoque Les.	Micromoles dégradées	0,84	1,82	1,64	0,44	0,86	0,60	0,42	0,80
	% de dégradation	*40*	*84*	*80*	*24*	*48*	*32*	*24*	*44*
	Micromoles dégradées	0,54	1,02	1,04	0,56	1,06	0,64	0,14	0,62
	% de dégradation	*24*	*46*	*50*	*32*	*60*	*34*	*6*	*32*
PENICILLINASE (extraite de BACILLUS CEREUS) NEUTRAPEN (CALBIOCHEM)									
Neutrapen 100 U/ml	Micromoles dégradées	2,10	2,14	1,12	0	0	1,77	1,13	0,33
	% de dégradation	*100*	*100*	*53*	*0*	*0*	*95*	*63*	*18*

ESCHERICHIA COLI : germes de collection : Normaflore et K 12 *Germes ayant reçu par transfert un facteur de polyrésistance* *E. coli J 5 — R Proteus 48* *E. coli J 5 — R Serratia 309*		*Benzyl-pénicilline*	*Ampicilline*	*SUVIPEN*	*Oxacilline*	*Méthicilline*	*Phénéthicilline*	*Carbénicilline*	*Céphalomidine*
J 5 — R 48 Souche A	Micromoles dégradées	2,06	2,10	1,97	1,60	1,38	1,79	1,71	0,98
	% de dégradation	98	98	95	94	78	96	96	54
J 5 — R 48 Souche B	Micromoles dégradées	2	2,08	1,97	1,60	1,06	1,79	1,71	0,98
	% de dégradation	95	97	95	94	61	96	96	54
J 5 — R 309 Souche A	Micromoles dégradées	2,06	2,10	1,95	1,64	1	1,83	1,71	1,03
	% de dégradation	98	98	94	96	58	98	96	58
J 5 — R 309 Souche B	Micromoles dégradées	2,06	2,07	1,85	1,64	0,86	1,83	1,71	1,01
	% de dégradation	98	96	90	96	49	98	96	55
Normaflore	Micromoles dégradées	0	0,21	0,60	0	0,34	0	0	0,06
	% de dégradation	0	9	29	0	19	0	0	3

MORAXELLA		*Benzyl-pénicilline*	*Ampicilline*	*SUVIPEN*	*Oxacilline*	*Méthicilline*	*Phénéthicilline*	*Carbénicilline*	*Céphalosporidine*
Moraxella Tho. Péni : R Ampi : R	Micromoles dégradées	2	2,06	1,17	1,13	0	1,70	1,62	0,33
	% de dégradation	*95*	*96*	*57*	*65*	*0*	*91*	*91*	*17*
Moraxella Bel. Péni : R Ampi : R	Micromoles dégradées	0	0	0,41	0	0	0	0	0
	% de dégradation	*0*	*0*	*20*	*0*	*0*	*0*	*0*	*0*
Moraxella Pas. Péni : R Ampi : R	Micromoles dégradées	0	0	0,41	0	0	0	0	0,18
	% de dégradation	*0*	*0*	*20*	*0*	*0*	*0*	*0*	*10*
Moraxella Ber.	Micromoles dégradées	0	0,21	0,65	0	0	0,12	0	0,12
	% de dégradation	*0*	*9*	*31*	*0*	*0*	*6*	*0*	*6*
Moraxella Cast.	Micromoles dégradées	0	0	0	0	0	0	0	0
	% de dégradation	*0*	*0*	*0*	*0*	*0*	*0*	*0*	*0*

EXTRACTION ET PURIFICATION D'UNE β LACTAMASE

MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE AU COURS DES DIFFERENTES ETAPES

L'Enterobacter cloacae 53 de Smith élabore une endopénicillinase que nous avons extraite au laboratoire pour diverses investigations. Les étapes d'extraction, puis de purification sont nombreuses. Aussi, est-il intéressant de suivre l'évolution de l'activité enzymatique de chacune d'elles.

EXTRACTION ET PURIFICATION.

Nous ne donnerons qu'un résumé des principales manipulations qui nous ont permis d'obtenir une enzyme parfaitement purifiée (11).

Après culture de 18 h. en milieu BPG, les germes sont recueillis par centrifugation à 12000 tours/mn. Ils subissent ensuite un traitement de désintégration aux ultra-sons : ils sont mis en suspension en tampon phosphate 0,1 M pour plusieurs lavages, puis une suspension finale à 50 mg de germes/ml subit le traitement aux ultrasons par fractions de 5 ml pendant 2 mn. Après centrifugation à 5000 g, le surnageant est récupéré. A ce niveau, un dosage d'activité enzymatique est pratiqué en même temps qu'un dosage de protéines.

A cette phase de *désintégration* succède la phase d'*extraction*.

Dans un premier temps, *on élimine les débris cellulaires et les ribosomes*. L'extrait cellulaire précédemment obtenu est centrifugé à 30 000 g pendant 2 heures à 2° C. Après décantation le surnageant est centrifugé à 100 000 g à 2° C. Le culot contenant les ribosomes est éliminé.

Puis on élimine les acides nucléiques par la streptomycine, selon la technique de MOSKOWITZ (20) et coll., déjà utilisée par SAWAÏ (28).

On additionne 250 ml de surnageant de sulfate de streptomycine à la concentration finale de 2 mg par ml. Un précipité se forme immédiatement. Après 4 h. de repos à 2° C, le précipité est éliminé par centrifugation pendant 20 mn à 13 000 g, toujours à la température de 2° C.

La streptomycine doit être éliminée rapidement car elle dénature l'enzyme. On y parvient par dialyse du surnageant pendant 48 h. contre de l'eau distillée. On observe l'apparition d'un léger précipité que l'on élimine par centrifugation à 19 000 g à 2° C.

PURIFICATION DE LA β LACTAMASE PAR FRACTIONNEMENT DES PROTEINES.

La solution enzymatique précédente est concentrée par dialyse à 2° C contre une solution de polyvinylpyrrolidone à 25 pour cent en tampon phosphate pH 6, 10 mM.

Le concentré après centrifugation à 13 000 g, est appliqué à la partie inférieure d'une colonne de Séphadex G 50 éliquilibrée avec du tampon phosphate 10 mM pH 6. L'élution ascendante est réalisée par le même tampon à la vitesse de 1,8 ml/mn. Des fractions de 5 ml sont recueillies et l'activité enzymatique dosée sur chaque fraction. L'activité enzymatique est située dans les fractions 24 à 32.

La solution enzymatique est concentrée par dialyse et filtrée sur Séphadex G 75 en tampon phosphate pH 6, 10 mM. Après élution, l'enzyme est présente dans les fractions 19 à 44.

68 pour cent environ de l'activité est renfermée dans les fractions 20 à 28.

La solution enzymatique recueillie est chromatographiée sur échangeurs d'ions : CM Séphadex C 50. L'élution est réalisée par un gradient linéaire phosphate-NaCl de force ionique 0,012 à 0,15. 85 pour cent de l'activité enzymatique sont situés dans les fractions 98 à 107.

Contrôle de pureté.

La β lactamase obtenue concentrée par dialyse est appliquée à la partie inférieure d'une colonne de Séphadex G 75, l'élution étant réalisée par le tampon phosphate pH 6, 10 mM. Des fractions de 3 ml sont recueillies.

97,5 pour cent de l'activité enzymatique sont retrouvés dans 9 fractions d'activité spécifique respective :

1. 82 900
2. 82 100
3. 83 100
4. 82 700
5. 82 300
6. 82 100
7. 82 800
8. 82 600
9. 82 700 unités par mg de protéine.

L'activité spécifique est constante dans les 9 fractions, à l'erreur expérimentale près due à la dilution. L'élution n'a pas entraîné de fractions protéiques sans activité enzymatique.

A l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, une fraction lyophilisée de l'enzyme dissoute dans 25 µl d'eau bidistillée donne une seule bande de faible migration électrophorétique. La β lactamase se comporte donc comme un produit homogène.

Du point de vue activité enzymatique, nous pouvons résumer les différentes étapes dans le tableau suivant :

Tableau n° 26

Etapes de purification	*Activité recueillie (Unités)*	*Activité spécifique*	*Rendement pourcentage par étape*	*Total*
ésintégration aux U.S.	1 206 000	196	100	100
entrifugation 30 000 g	1 182 000	188	98,2	98,2
10 000 g	1 149 000	185	97,1	94,5
raitement à la Streptomycine t dialyse	1 088 000	186,5	95,1	88,4
iltration sur Séphadex G 50	540 000	959	49,8	44,5
iltration sur Séphadex G 75	366 500	4 530	67,5	30,3
hromatographie sur CM éphadex C 50	310 000	82 900	85	16,6
iltration sur Séphadex G 75 contrôle de pureté)	302 600	82 600	97,6	26

DISCUSSION GENERALE

Le dosage chimique des β lactamines peut être réalisée par deux groupes de méthodes :

. *indirectes :* essentiellement iodométriques et microiodométriques qui déterminent l'acide pénicilloïque libéré après hydrolyse.

. *directes :* qui dosent directement la molécule de β lactamines. La formation d'hydroxamates ferriques appartient à ce groupe. De nombreuses variantes techniques ont été proposées pour l'ensemble des méthodes, certaines sont adaptées à l'autoanalyse. La technique que nous proposons est une méthode directe dérivée de celles de FORD et SNELL. Elle permet de déterminer 1 µg/ml de la plupart des β lactamines dont la benzylpénicilline, l'ampicilline. Par sa sensibilité elle rejoint donc les méthodes microiodométriques.

COMPARAISON AVEC LES METHODES DE FORD ET SNELL.

Les méthodes de FORD et SNELL présentaient un seuil de sensibilité de 100 µg/ml. Elles sont jugées peu reproductibles et inadaptées aux études enzymatiques. La technique proposée doit sa sensibilité à :

. *L'adaptation autoanalytique :*

Le flux continu est nécessaire à cette réaction. La lecture colorimétrique à délai constant assure la reproductibilité de la technique en raison de l'instabilité du complexe formé après 3 mn.

. *La modification de la composition des réactifs.*

L'augmentation de la concentration du réactif B en sel ferrique entraîne une augmentation de l'absorption du complexe formé.

La concentration du réactif A en hydroxylamine a été maintenue à la valeur proposée par SNELL. Toute augmentation provoque une diminution de l'intensité colorée par réduction des complexes formés.

. *Choix du tampon pH 7 pour les applications enzymatiques.*

Les tampons phosphates ont été rejetés en raison de leur effet hypochrome. Ils provoquent également la formation de précipités abondants qui perturbent la circulation du flux continu.

. *Suppression de l'alcool 95c introduit par SNELL.*

On obtient ainsi une ligne de base parfaitement stable à l'enregistrement, notamment lors de l'emploi de la cuve de 5 cm.

La présence d'alcool provoque l'apparition de microbulles lors du contact avec le réactif A, responsables de l'instabilité de la ligne de base.

. *Une étude des rapports entre l'échantillon et les réactifs A et B.*

Cette amélioration n'est possible que si l'on réalise un système de débullage au niveau du prélèvement pour éliminer les bulles d'air formées lors des mouvements du préleveur, en raison de l'augmentation du volume de l'échantillon.

. *Amplification de la détection colorimétrique* par emploi d'une cuve de 5 cm de parcours optique et d'un système d'expansion d'échelle sur l'enregistreur.

COMPARAISON AVEC LES METHODES MICROIODOMETRIQUES.

La méthode proposée présente la même sensibilité que la méthode de NOVICK et son adaptation autoanalytique selon LINDSTROM et NORDSTROM.

Sur ces méthodes la technique proposée présente les avantages suivants :

. *Absence de fixation de réactifs* sur les tuyaux du Manifold suivis de relargages incontrôlables (cas de l'iode).

. *Echelle de concentrations étendue* permettant de déterminer, sans changement technique, des concentrations comprises entre 0 et 100µg/ml.

L'échelle de concentrations des méthodes microiodométriques est de 15µg/ml.

. *Phénomènes d'interférences* dans les milieux complexes et au cours des études enzymatiques. Les méthodes iodométriques et microiodométriques apprécient la consommation d'iode réalisée par l'acide pénicilloïque qui n'est pas le seul consommateur d'iode. Après hydrolyse de la molécule, d'autres produits de dégradation parmi lesquels la pénicillamine, consomment de l'iode.

Dans les milieux utilisés en bactériologie, les acides aminés soufrés consomment également de l'iode.

La formation d'hydroxamates ferriques n'est pas spécifique des β lactamines. La plupart des esters et dérivés d'acides carboxyliques réagissent à des degrés différents.

Lors des études enzymatiques et du contrôle de spécialités pharmaceutiques, sur des solutions pures ne nécessitant pas d'hydrolyse préalable, il n'y a aucune source d'interférence.

La technique est également applicable aux dosages en milieux bactériologiques complexes, à l'exception du milieu de Dubos qui contient du Tween 80.

La technique est applicable aux milieux biologiques, tel l'urine, après élimination des chromogènes, responsables d'interférences, par chromatographie sur couche mince et récupération de la fraction β lactamine parfaitement isolée.

La sensibilité de cette technique confirmée par des études statistiques, sa reproductibilité et sa grande souplesse d'utilisation nous ont permis de l'appliquer à l'étude des β lactamases.

Elle nous a permis de :

. *Déterminer les constantes cinétiques* d'enzymes purifiées du commerce ou d'enzymes purifiées au laboratoire. Bien que nos conditions opératoires soient différentes de celles réalisées par d'autres auteurs, les valeurs de Km sont sensiblement du même ordre de grandeur pour des β lactamases issues de souches voisines.

. *D'évaluer l'activité β lactamasique* de souches bactériennes : germes entiers ou enzymes isolées, et d'établir leurs profils d'activité. Ceux-ci en étroite dépendance avec les données cinétiques, permettent une comparaison des souches testées dans les mêmes conditions opératoires.

. *Suivre l'expression enzymatique* d'un plasmide au cours de transferts successifs.

. *De déterminer les cinétiques de dégradation* de différents substrats et du mélange de deux substrats : benzylpénicilline et ampicilline. Les cinétiques de chaque substrat, impliquées dans le mélange, conduisent à la notion de substrat préférentiel.

C O N C L U S I O N S

Nous présentons une méthode autoanalytique sensible qui permet, par formation d'hydroxamates ferriques, de déterminer 1 µg/ml de la plupart des β lactamines. Elle dérive des techniques de FORD et de SNELL. Sa sensibilité est due à :

. *l'automatisation*

. *la modification de la composition des réactifs* (étude des concentrations, choix du tampon, suppresion de l'alcool à 95c)

. *la modification des rapports de volumes* entre échantillon et réactifs

. *l'amplification de la détection* colorimétrique.

Cette méthode a été appliquée essentiellement à l'étude des β lactamases et a permis :

. *la détermination de l'activité* d'enzymes purifiées ou en cours de purification

. *la détermination des constantes enzymatiques Km et Vm*

. *la détermination des "profils d'activité"* de souches bactériennes, germes entiers ou enzymes isolées

. *l'enregistrement continu des cinétiques* de dégradation de différents substrats et de mélange de substrats

. *l'étude de transferts de β lactamases.*

B I B L I O G R A P H I E

1. ALICINO J. F. - Iodometric assay of natural and synthetic penicilline, 6 aminopenicillanic acid and cephalosporin C.
An. Chem. 1961, 33, 648-657.

2. AVANZINI F., MAGNANELLI D. et CERRONE G. - An automated assay of penicillins in fermentation using hydroxylamine reagent but curriding penicillinase.
Autom. in anal. chem., 1966. Symposium Technicon.

3. BOXER G. E. et EVERETT P. M. - Colorimetric determination of benzylpenicillin.
An. Chem., 1949, 21, 670-673.

4. CASTAGNOU F. - Sur la dégradation bactérienne des pénicillines. Rôle de la pénicillamine dans l'effet antibiotique.
Thèse Doct. Sciences, 1971, Bordeaux n° 326.

5. CHABBERT Y. A. - L'antibiogramme. Collection "Technique de base".
Editions de la Tourelle.

6. CITRI N., MARTIN R., POLLOCK - The biochemistry and function of bêta-lactamase.
Adv. Enzymol., 28, 237-323.

7. DESSAUT B. - Les variations d'expression enzymatique du facteur de résistance aux pénicillines au cours de transferts hétérospécifiques.
Thèse de 3ème cycle de Sciences. Bordeaux, 1973, n° 1087.

8. FERRARI A., RUSSO ALESI F. M. et KELLY J. M. - A completely automated system for the chemical determination of Streptomycin and Penicillin in fermentation media.
An. Chem., 1959, 31, 1710-1717.

9. FORD J. H. - Hydroxylamine method of determining peni cillins.
An. Chem. 1947, 19, 1004-1006.

10. GOODALL R. R. et DAVIES R. - Automatic determination of penicillin in fermentation broth.
Analyst., 1961, 86, 326-335.

11. GOURMELON P. - Purification de la bêta-lactamase de l'Enterobacter cloacae 53 (Smith).
Thèse de Doct. Med. Bordeaux, n° 213 - 1972.

12. HAMILTON-MILLER J. M. T., SMITH J. T. and KNOX R. - The estimation of penicillins and penicillin destruction.
J. Pharm. Pharmacol., 15, 81-91.

13. HENRY R. G. et HOUSEWRIGHT R. D. - Studies on penicillinase - Manometric method of assaying penicillinase and penicillin, kinetics of penicillinase reaction and the effects of inhibitors on penicillinase.
J. Biol. Chem., 1947, 167, 559.

14. JOHNSON K., DUSSART J., CAMPBELL J. N., GHUYSEN J. M. - Exocellular bêta-lactamase of Streptomyces albus G and strains R 39 and K 11.
Antimicrobial agents and chem., 1973, vol. 3, 289-298.

15. KAZMIERCZAK A., PHILIPPON A., CHARDON H., LABIA R. et LE GOFFIC F. - Constantes enzymatiques (Km et Vmax) des bêta-lactamases mesurées par une méthode micro-acidimétrique couplée à l'ordinateur.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 124 B, n° 3, 1973, 259-267.

16. KNOX R. et SMITH J. T. - Antibacterial activity. Penicillinase stability and inducing ability of different penicillins.
J. Gen. Microbiol., 1962, 28, 471-479.

17. LATRILLE J. - Sphéroplastes et antibiose.
Thèse Doct. Sciences, 1965, Bordeaux, n° 152.

18. LINDSTROM et NORDSTRUM Kurt - Automated method for determination of penicillins, cephalosporins and penicillinases.
Ant. Ag. and Chem., 1972, 100-106.

19. LIPMANN and TUTTLE - J. Biol. Chem., 159, 21 (1945).

20. MOSKOWITZ M. - Differences in precipitability of nucleic acids with Streptomycin and Dihydrostreptomycin.
Nature, 1963, 200, 335-337.

21. NIEDERMEYER A. O., RUSSO-ALESI F. M., LENDZIAN C. A. et KELLY J. M. - Automated system for continuous determination of penicillin in fermentation media using hydroxylamine reagent.
An. Chem. 1960, 32, 664-666.

22. NOVICK R. P. - Microiodometric assay for penicillinase.
Biochem. J., 1962, 83, 236-240.

23. O'CALLAGHAN C. H. and MORRIS A. - Inhibition of bêta-lactamases by bêta-lactam antibiotics.
Ant. Ag. and Chem., 1972, vol. 2, n° 6, 442-448.

24. PERRET C. J. - Iodometric assay of penicillinase.
Nature (London), 1954, 174, 1012-1013.

25. PLOWMAN K. M. Ph. D. - Enzyme kinetics.
Series in advanced chemistry 1972.
Ed. Mc Graw-Hill (USA).

26. RICHMOND M. H. et SYKES R. B. - The bêta-lactamases of Gram negative bacteria and their possible physiological role.
Adv. in Microb. Physiol., 1973, vol. 9, 31-88.

27. RODWELL V. Ph. D. - Les enzymes. Dans Précis de Biochimie.
Harold A. Harper. Armand Colin, Paris 1969.

28. SAWAI T., TAKAHASHI K., YAMAGISHI S., MITSUHASHI S. - Variant of penicillinase mediated by an R factor in Escherichia coli.
J. Bact., 1970, 104, 620-629.

29. SCUDI J. V. - A colorimetric method for the determination of penicillins.
J. Biol. Chem., 1946, 164, 183.

30. SNELL and SNELL - Colorimetric methods of analysis.
3ème Ed. 1954, vol. IV, 537. D. Van Nostrand Ed.

31. STAAB F. W., RAGAN E. A. and BINKLEY S. B. (1946) - Abs. 109 th meeting Amer. Chem. Soc. 3 B.

32. TUCKER R. G. - Nature 1954, 173, 85. In Hamilton-Miller.
Pharm. Pharmacol., 15, 81-91.

EDITIONS BERGERET -71, rue Leyteire 33000 BORDEAUX-
Tél. 91.12.59

TABLE DES ENREGISTREMENTS

		Page
N° 1.	Courbe d'étalonnage de la Benzyl-pénicilline	31
N° 2.	Reproductibilité des résultats. 1ère méthode. Série II	31
N° 3.	Analyse statistique. 1ère étude. Série n° 3	44
N° 4.	Analyse statistique. 2ème étude. Série n° 1	44
N° 5.	Analyse statistique. 2ème étude. Série n° 2	45
N° 6.	Analyse statistique. 2ème étude. Série n° 3	45
N° 7.	Courbe d'étalonnage de la benzyl-pénicilline entre 10 et 750 γ/ml	50
n° 8.	Courbe d'étalonnage de la benzyl-pénicilline entre 2,5 et 250 γ/ml	50
N° 9.	Courbe d'étalonnage de la benzyl-pénicilline entre 1 γ et 75 γ/ml	50
N° 10 à 22.	Courbes d'étalonnage des principales β lactamines	52
N° 23.	Hydrolyse alcaline de la céphalo-tine	69

Page

N° 24. Profil n° 1 - Pseudomonas aeruginosa 72

N° 25. Profil n° 2 - Serratia 329 hébergeant le facteur de polyrésistance transféré du Proteus 48 72

N° 26. Détermination des constantes de l'enzyme N eutrapen. Substrat pénicilline V 91

N° 27. Dégradation de l'Ampicilline. Enzyme Neutrapen. Enregistrement continu 104

N° 28. Profil d'activité de la souche Escherichia coli J_5 R_{48} 122

N° 29. Profil d'activité de la souche Sammonella Cha. 122

PRINCIPAUX TABLEAUX

		Page
Tableau n° 1.	Etude comparée des méthodes de dosage chimique des β lactamines	16
Tableau n° 2.	Mode opératoire : méthode de Ford	24
Tableau n° 3.	Résultats de la première étude statistique	42
Tableau n° 4.	Résultats de la deuxième étude statistique	44
Tableau n° 5.	Position comparée des méthodes de dosage des β lactamines	62
Tableau n° 6.	Protocole technique de détermination des Km et Vm	89
Tableau n° 7.	Résultats de la détermination des constantes enzymatiques de l'enzyme Neutrapen vis-à-vis de la pénicilline V	90
Tableau n° 8.	Valeurs des Vm et Km pour les différents substrats testés - Enzyme Neutrapen	92
Tableau n° 9.	Détermination des constantes cinétiques du Neutrapen pour la Benzylpénicilline, l'Ampicilline et l'Hétacilline	93

Page

Tableau n° 10. Détermination des constantes cinétiques du Neutrapen pour la Métampicilline, la Phénéthicilline et la Carbénicilline 94

Tableau n° 11. Constantes enzymatiques selon CITRI 97

Tableau n° 12. Constantes enzymatiques selon JOHNSON et GHYSEN 97

Tableau n° 13. Constantes enzymatiques selon LABIA et LE GOFFIC 98

Tableau n° 14. Extractions différentielles de la Benzyl pénicilline et de l'Ampicilline 108

Tableau n° 15 à 25. Pourcentages de dégradation de différents substrats par 64 souches bactériennes 124-131

Tableau n° 26. Etude de l'activité enzymatique au cours de l'extraction et purification de la β lactamase de l'Enterobacter cloacae 53 de SMITH 135

TABLE DES FIGURES

		Page
N° 1.	Hydrolyse des β lactamines	6
N° 2.	Spectre d'absorption du complexe hexacoordiné du Fer	20
N° 3.	Montage du Manifold. Diagramme des flux. 1ère adaptation	29
N° 4.	Montage du Manifold. Diagramme des flux. 2ème adaptation	38
N° 5.	Comparaison entre le dosage automatique à l'hydroxylamine et le dosage microbiologique de l'ampicilline	47
N° 6.	Contrôle d'un échantillon commercial de Métampicilline	48
N° 7.	Courbes d'étalonnage des solutions de Benzylpénicilline dans différents milieux de culture	60
N° 8.	Courbes d'étalonnages des principales β lactamines (correspondantes aux photos 10 à 23)	64
N° 9.	Influence de la concentration d'enzyme sur la vitesse de la réaction enzymatique	81
N° 10.	Influence de la concentration en substrat sur la vitesse de la réaction enzymatique	82

Page

N° 11. Graphique de LINEWEAVER BURKE 84

N° 12. Influence du pH sur la vitesse de réaction enzymatique 85

N° 13. Courbes de détermination des Km et Vm pour l'enzyme Neutrapen. Substrats : Ampicilline, Benzylpénicilline, Pénicilline V et Métampicilline 95

N° 14. Courbes de détermination des Km et Vm pour l'enzyme Neutrapen. Substrats : Carbénicilline, Hétacilline et Phénéthicilline 96

N° 15. Cinétiques de dégradation des substrats. Enregistrements continus 102

N° 16. Dégradation du mélange benzylpénicilline ampicilline. Extractions différentielles 109

N° 17. Variations des pourcentages d'hydrolyse en fonction du poids sec de germes 111

N° 18. Détermination d'un profil d'activité β lactamasique 115

N° 19. Profil d'activité du Pyocyanique Ber. 116

TABLE DES MATIERES

	Page
I. INTRODUCTION	1
II. PREMIERE PARTIE. ETUDE CHIMIQUE ET ANALYTIQUE. DOSAGE DES β LACTAMINES ..	9
A. Les méthodes chimiques de dosage des β lactamines	10-
B. Etude de la réaction de FORD	18
C. Adaptation personnelle à l'auto-analyse de la méthode de SNELL	28
D. Sensibilisation de la technique précédente. Technique sensibilisée	37
E. Comparaison de la technique sensibilisée avec les méthodes micro-iodométriques	57
F. Comparaison avec la technique de FORD	61
G. Application à l'étude de la structure chimique des β lactamines	63
III. DEUXIEME PARTIE. QUELQUES APPLICATIONS DE LA TECHNIQUE PROPOSEE A L'ETUDE DES β LACTAMASES	74

Page

A. Conditions générales d'application à l'étude des β lactamases 75

B. Application à la détermination des constantes cinétiques 79

C. Exemple de détermination des constantes cinétiques pour différents substrats. Etude de l'enzyme Neutrapen 87

D. Etude de la dégradation des substrats par les β lactamases. Enregistrements continus 100

E. Détermination des profils d'activité β lactamasique de différentes souches bactériennes 110

F. Extraction et purification d'une β lactamase. Mesure de l'activité enzymatique au cours des différentes étapes 132

IV. DISCUSSION GENERALE 136

VII. CONCLUSIONS 141

BIBLIOGRAPHIE 142

EDITIONS BERGERET,71/73,rue Leyteire 33000 BORDEAUX T.(56) 91 12 59

DEUXIÈME THÈSE

LA DETERMINATION DU RAPPORT LECITHINE/SPHINGOMYELINE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

Son intérêt en médecine périnatale

Vu,
Le Président DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX II :
H. BRICAUD

Vu, bon à imprimer,
Le Président de Thèse :
P. MESNARD

Bon et permis d'imprimer,
Bordeaux, le 25 juin 1974
Le Chancelier des Universités :
R. PAULIAN